

**Über die Flavoninhaltsstoffe von  
*Polygonum orientale* L.**

**Günther Wildi**



Über die Flavoninhaltsstoffe von  
Polygonum orientale L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Günther WILDI

aus

Saarburg

Juni 1958



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

20. Juli 1958

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                             | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung . . . . .                                                                                                                                                                                     | 1     |
| B. Allgemeiner Teil . . . . .                                                                                                                                                                               | 3     |
| I. Bisherige Untersuchungen über <i>Polygonum orientale</i> L. . . . .                                                                                                                                      | 3     |
| II. Eigene Untersuchungen . . . . .                                                                                                                                                                         | 4     |
| 1. Isolierung von zwei Flavonglykonen aus den Blüten von <i>Polygonum orientale</i> L. und ihre Identifizierung als Kämpferol (3,5,7,4'-Tetraoxyflavon) und Quercetin (3,5,7,3'4'-Pentaoxyflavon) . . . . . | 5     |
| 2. Isolierung der Flavonglykoside V und W aus den Blüten von <i>Polygonum orientale</i> L. und ihre Identifizierung als Kämpferol-3-rhamnosid und Quercetin-3-rhamnosid . . . . .                           | 10    |
| 3. Isolierung der Nebenflavone aus den Blättern von <i>Polygonum orientale</i> L. . . . .                                                                                                                   | 19    |
| 4. Weitere Versuche zur Identifizierung von Substanz C und Orientosid . . . . .                                                                                                                             | 25    |
| 5. Identifizierung von Orientosid als Vitexin und Substanz C als Saponaretin . . . . .                                                                                                                      | 35    |
| 6. Weitere Untersuchungen über Orientin . . . . .                                                                                                                                                           | 43    |
| 7. Stellungnahme zu den IR-spektroskopischen Arbeiten von F.GLOGGENGIESER und neue IR-spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von Orientosid und Orientin . . . . .                                    | 48    |
| 8. Über das UV-spektrophotometrische Verhalten von Orientosid und Orientin, diskutiert an Hand der von W.H. EVANS für Vitexin vorgeschlagene Strukturformel . . . . .                                       | 52    |
| C. Experimenteller Teil . . . . .                                                                                                                                                                           | 58    |
| 1. Isolierung der Blütenflavone von <i>Polygonum orientale</i> L. . . . .                                                                                                                                   | 58    |
| a. Bereitung des Rohextraktes . . . . .                                                                                                                                                                     | 58    |
| b. Trennung der Flavonoide . . . . .                                                                                                                                                                        | 59    |

|                                                                                      | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3. Präparative Papierchromatographie .                                               | 59    |
| II. Isolierung der Blätterflavone A-B-C<br>aus <i>Polygonum orientale</i> L. . . . . | 61    |
| 1. Bereitung des Rohextraktes . . . . .                                              | 61    |
| 2. Isolierung von Substanz A . . . . .                                               | 61    |
| 3. Isolierung von Substanz B . . . . .                                               | 62    |
| 4. Isolierung von Substanz C . . . . .                                               | 62    |
| 5. Farbreaktionen . . . . .                                                          | 63    |
| 6. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt .                                              | 64    |
| 7. Absorptionsspektrum . . . . .                                                     | 64    |
| 8. Papierchromatographie . . . . .                                                   | 64    |
| 9. Quantitative Hydrolyse . . . . .                                                  | 64    |
| 10. Neutralisation der Zucker . . . . .                                              | 65    |
| 11. Papierchromatographie der Zucker .                                               | 65    |
| 12. Zucker-Osazone . . . . .                                                         | 66    |
| 13. Azetylierung der Aglykone . . . . .                                              | 66    |
| 14. Methylierung von Glykosid W . . . .                                              | 66    |
| III. Versuche zur Identifizierung von Sub-<br>stanz C, Orientosid und Orientin . . . | 67    |
| 1. Säurehydrolyse . . . . .                                                          | 67    |
| 2. Enzym-Hydrolyse . . . . .                                                         | 67    |
| 3. Isolierung der Aglykone . . . . .                                                 | 69    |
| 4. Untersuchung auf Zucker . . . . .                                                 | 70    |
| 5. Perjodsäure-Oxydation . . . . .                                                   | 70    |
| 6. Eisen-III-Chlorid-Oxydation . . . .                                               | 71    |
| 7. Katalytische Hydrierung . . . . .                                                 | 72    |
| 8. IR-Spektren . . . . .                                                             | 72    |
| 9. UV-spektrophotometrische Untersu-<br>chungen . . . . .                            | 73    |

## A. Einleitung

In einer Übersicht über die Flavone der Polygonaceen, die sich auf papierchromatographische Untersuchungen stützten <sup>1)</sup>, sahen wir, dass sich zahlreiche Arten dieser Familie durch das gemeinsame Vorkommen von Querzetin und Querzetin-3-Glykosiden auszeichneten.

Einige Arten der Gattung Polygonum liessen eine abweichende Glykosidführung erkennen. Es waren Derivate der Grundreihe verschwunden, dafür Flavone hinzugekommen, die papierchromatographisch mit keinem der für die Familie bisher als charakteristisch angesehenen Flavone übereinstimmen. Um einerseits die mit Hilfe der Papierchromatographie gewonnenen Ergebnisse zu sichern, andererseits auch die neu aufgetretenen Heteroside zu identifizieren, mussten aus einzelnen im "Flavonbild" besonders abweichenden Arten dieser Gattung, die Flavone isoliert und charakterisiert werden.

Bereits in der papierchromatographischen Übersicht hatte K.MÜLLER gefunden, dass sich besonders Polygonum orientale in der Flavonführung von den meisten anderen Polygonaceen unterschied. F.GLOGGENGIESSER <sup>2)</sup> isolierte aus den Blättern die zwei Hauptflavone Orientosid und Orientin und charakterisierte sie als Apigenin- bzw. Luteolin-Derivate. Diese beiden Flavone schienen, da sie sich mit den herkömmlichen Mitteln nicht hydrolysieren liessen, einem neuen Glykosidtyp anzugehören.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nun zunächst die Blüten von Polygonum orientale auf ihre Flavone zu untersuchen und diese zu isolieren, wobei besonderes Augenmerk darauf zu richten war, ob die Blütenflavone mit den für die Gattung Polygonum charakteristischen Typus übereinstimmen.

---

1) K.MÜLLER, Dissertation, Universität München (1954)

2) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)

Anschliessend sollten auch die in den Blättern papierchromatographisch nachgewiesenen Nebenglykoside isoliert und identifiziert werden.

Nachdem F.GLOGGENGIESSER bei seinen Untersuchungen über Orientosid und Orientin nur zu Teilergebnissen gelangt war, bestand die weitere Aufgabe darin, die bisher vorwiegend IR- und UV-spektrophotometrisch durchgeführten Arbeiten durch oxydative und reduktive Abbauprobversuche zu ergänzen und soweit möglich die "Zuckerreste" in ihrer Struktur aufzuklären.

## B. Allgemeiner Teil

### I. Bisherige Untersuchungen über Polygonum orientale L.

K.MÜLLER <sup>1)</sup> stellte in den Blättern papierchromatographisch das Vorhandensein von fünf Flavonen fest, die mit den Buchstaben A, B, C, D und E bezeichnet im System Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) folgenden  $R_F$ -Wert besaßen:

| <u>Flavon:</u> | <u><math>R_F</math>-Wert:</u> |
|----------------|-------------------------------|
| Substanz A     | 0,80                          |
| Substanz B     | 0,67                          |
| Substanz C     | 0,51                          |
| Substanz D     | 0,37 (Orientosid)             |
| Substanz E     | 0,31 (Orientin)               |

Das "Hauptglykosid" der Pflanze, Substanz D, das wir Orientosid nannten, wurde isoliert und beschrieben. Es gelang K.MÜLLER jedoch nicht, das "Glykosid" mit Salz- bzw. Schwefelsäure zu hydrolysieren.

F.GLOGGENGIESSER <sup>2)</sup> beschäftigte sich in seinen Arbeiten mit den Substanzen D und E (Orientosid und Orientin). Beide Stoffe erwiesen sich, wie bereits K.MÜLLER erkannte, als schwer hydrolysierbar. Nach einer neuen Hydrolysenmethode mit schwefelsaurem Äthylenglykol <sup>3)</sup> wurden geringe Mengen der Substanzen gespalten und die Aglykone papierchromatographisch als Luteolin bzw. Apigenin ermittelt. Zuckeranteile konnte er jedoch offenbar wegen der geringen Hydrolysierbarkeit, noch nicht nachweisen. Auf Grund IR-spektroskopischer Untersuchungen nahm er an, dass es sich aber um Glykoside handelte.

Wie die UV-spektrophotometrischen Messungen ergaben, sollte es sich bei Orientosid um ein Apigenin-4'-glykosid und bei Orientin um ein Luteolin-7-glykosid handeln.

- 1) K.MÜLLER, Dissertation. Universität München (1954)
- 2) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)
- 3) H.R.ARTHUR u.W.H.HUI u.C.N.MA, J.Chem.Soc.(London) 632 (1956)

## II. Eigene Untersuchungen

### Papierchromatographische Voruntersuchungen der Blüten

Die getrockneten, roten Blüten von *Polygonum orientale* extrahierten wir mit Methanol und stellten daraus in der üblichen Weise einen wässrigen Gesamtextrakt her. Zur orientierenden Voruntersuchung dieses Extraktes auf Flavone bedienten wir uns der Papierchromatographie, durch die das Vorhandensein von vier Flavonen festgestellt wurde. Das Papierchromatogramm das wir in Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) entwickelten, ergab folgendes Flavonbild:

| <u>Flavon:</u> | <u>R<sub>F</sub>-Wert:</u> |
|----------------|----------------------------|
| Substanz T     | 0,90                       |
| Substanz U     | 0,83                       |
| Substanz V     | 0,73                       |
| Substanz W     | 0,67                       |

Davon bildeten die Substanzen V und W die Hauptglykoside. Substanz T und U lagen in geringerer Konzentration vor und fluoreszierten im UV-Licht wie Aglykone mit grünlicher Farbe. Ein Vergleich der Blüten- und Blattflavone zeigte Differenzen in der "Flavonführung". Während die Hauptglykoside der Blätter vorzugsweise einen tiefen R<sub>F</sub>-Wert hatten, lagen die Blütenflavone in einem hohen R<sub>F</sub>-Bereich.

### Isolierung der Blütenflavone

Alle Versuche, die Trennung der 4 Flavone durch fraktionierte Ausschüttelung des wässrigen Gesamtextraktes mit Äther und Äthylazetat allein zu erreichen, hatten keinen Erfolg, da sich die Lösungsmittel als zu wenig selektiv erwiesen. Es gelang uns jedoch die Hauptmenge von Substanz T und Substanz U durch 15malige Ausschüttelung mit einer Mischung aus Äther-Petroläther (75+25) von den Glykosiden V und W abzutrennen und zu kristallisieren. Die im wässrigen Extrakt verbleibenden Glykoside V und W erhielten wir durch 20malige

Ausschüttelung mit Äthylazetat. Nach Abdestillation des organischen Lösungsmittels wurde der braun-gelbe Rückstand aus 70%igem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: Mischkristallinat Substanz T und U 212 mg,  
Mischkristallinat Substanz V und W 309 mg.

Wir haben durch diese Verteilung zwei Mischkristallinate erhalten, von denen das eine die "aglykonischen" (T und U), das andere die "glykosidischen" (V und W) Flavoninhaltsstoffe der Blüten enthielt. Die weitere Trennung und Isolierung der reinen Flavone erfolgte mittels präparativer Papierchromatographie und zwar durch Auftragen der Gemische auf Papierbögen, Entwickeln und Ausschneiden der Zonen vor der Analysenquarzlampe. Das Papier wurde dann eluiert, die Lösungen eingeeengt und die Flavone zur Kristallisation gebracht.

1. Isolierung von zwei Flavonaglykonen aus den Blüten von  
Polygonum orientale L. und ihre Identifizierung als  
Kämpferol (3,5,7,4'-Tetraoxyflavon) und Quercetin  
(3,5,7,3'4'-Pentaoxyflavon)

Substanz T

Aus 212 mg Mischkristallinat (Substanz T und U) erhielten wir die Substanz T nach papierchromatographischer Trennung über 30 Bögen Chromatographierpapier Schleicher & Schüll Nr.2043b Gl.. Als Lösungsmittel diente uns Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3). Die unter der UV-Lampe markierten Zonen wurden ausgeschnitten und mit Methanol eluiert. Dieses, auf ca. 20 ml konzentrierte methanolische Eluat reinigten wir von den mitgelösten Zellulosestoffen des Chromatographierpapiers, in dem wir die Lösungen über eine Magnesolsäule gaben. Im oberen Viertel der Säule wurden die Ballaststoffe in Form einer braun-grauen Zone adsorbiert. Die ablaufende, intensiv gelbgefärbte Flavonlösung kristallisierte beim Einengen aus. Die hellgelben Kristallnadeln (Ausbeute 221 mg) wurden mehr-

mals aus 70%igem Äthanol-Wasser umkristallisiert und im Trockenschrank bei 80°C getrocknet.

Mit Magnesium und Salzsäure <sup>1)</sup> farbte sich die Substanz tiefrot, nicht dagegen mit Zink und Salzsäure. Beim Zirkon-Zitronensäure-Test <sup>2)</sup> blieb der gelbe Zirkonkomplex nach dem Besprühen mit Zitronensäure bestehen. Diese Proben sprechen für ein Flavonol (3-Oxyflavon-Derivat).

Im UV-Licht fluoreszierte das Flavon vor dem Besprühen mit Aluminiumsulfatlösung gelb, nach dem Besprühen gelb-grün. Mit Bleiazetat erhielten wir eine grün-gelbe Fluoreszenz. Daraus wurde geschlossen, dass es sich um ein Flavonaglykon handelte <sup>3)</sup>.

Im papierchromatographischen Vergleich fanden wir in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen gleiche Laufhöhe mit authentischem Kämpferol. Im Mischschmelzpunkt trat keine Depression ein. Das UV-Absorptionsspektrum (s. Abb. 1) stimmte in den Maxima und im sonstigen Verlauf mit Kämpferol überein.

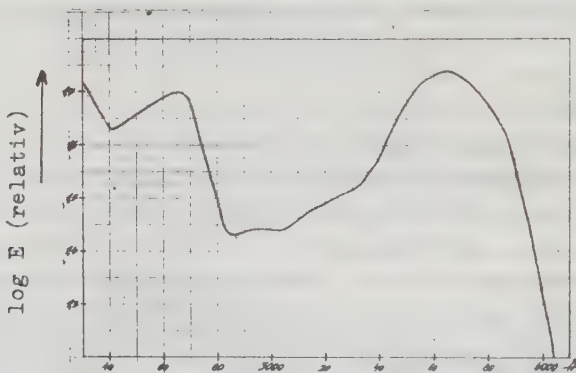
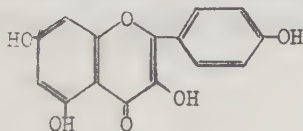


Abb. 1 UV-Absorptionsspektrum von Substanz T (Kämpferol)

- 
- 1) L.HÖRHAMMER u.K.H.MÜLLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharm. Ges. 287/59, 376 (1954)  
2) L.HÖRHAMMER u.K.H.MÜLLER, ibid. 287/59, 310 (1954)  
3) S.H.WENDER u.T.B.GAGE, Science 109, 287 (1949)

Das nach den üblichen Methoden durch Kochen mit Natriumazetat und Essigsäureanhydrid hergestellte Azetylderivat hatte einen Schmelzpunkt von 180°C. Mit authentischem Kämpferol-tetraazetat beobachteten wir beim Mischschmelzpunkt keine Schmelzpunktveränderung.

Substanz T war somit eindeutig als Kämpferol identifiziert. In der nachstehenden Tabelle 1 sind die Analysenwerte zusammengestellt.



Kämpferol

T a b e l l e 1

|                                          | <u>Substanz T</u>          | <u>Kämpferol</u> (auth.)   |
|------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <u>R<sub>f</sub>-Werte:</u>              |                            |                            |
| Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) | R <sub>f</sub> 0,90        | R <sub>f</sub> 0,91        |
| Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)          | 0,78                       | 0,78                       |
| Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)  | 0,38                       | 0,39                       |
| <u>Schmelzpunkt:</u>                     | 272-274°C                  | 270-274°C                  |
| <u>UV-Absorptionsspektrum:</u>           | Max <sub>I</sub> = 3650 Å  | Max <sub>I</sub> = 3650 Å  |
|                                          | Max <sub>II</sub> = 2665 Å | Max <sub>II</sub> = 2660 Å |
|                                          | 180°C                      | 180-182°C                  |
| <u>Acetat:</u> Schmelzpunkt              |                            |                            |

#### Substanz U

Die Trennung der Substanz T von Substanz U war, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, papierchromatographisch erfolgt. Wir waren hierbei von 212 mg Mischkristallisat ausgegangen. Die ausgeschnittenen Papierzonen mit der Substanz U

eluierten wir mit Methanol und reinigten das Eluat über eine Magnesolsäule. Im Anschluss daran gelangten wir ebenfalls zu einem gelbgefärbten Kristallisat.

Nach mehrmaliger Umkristallisation aus Äthanol-Wasser erhielten wir 26 mg reine Substanz U. Die Verbindung färbte sich ab  $279^{\circ}\text{C}$  braun und war bei  $304^{\circ}\text{C}$  unter Zersetzung geschmolzen.

Bei der Mischschmelzpunktbestimmung mit authentischem Querzetin trat keine Depression ein, das UV-Absorptionsspektrum (s. Abb. 2) hatte dieselben Maxima wie Querzetin.

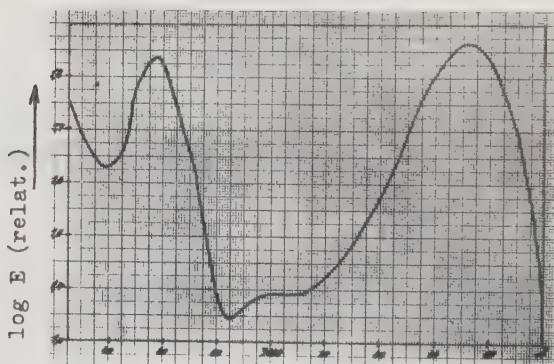
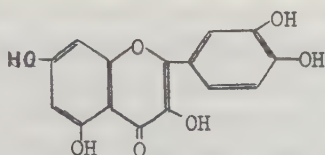


Abb. 2 UV-Absorptionsspektrum von  
Substanz U (Querzetin)

Die papierchromatographischen Untersuchungen ergaben in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen Übereinstimmung mit Querzetin.

Das dargestellte Azetylprodukt war im Schmelzpunkt wie in Mischschmelzpunkt mit authentischem Pentaazetylquerzetin identisch.

Somit handelt es sich bei Substanz U um Querzetin. Die Analysenwerte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.



Querzetin

T a b e l l e 2

|                                          | <u>Substanz U</u>                                       | <u>Querzetin</u><br>(auth.)                             |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <u>Schmelzpunkt:</u>                     | 290-304°C<br>(braun)                                    | 295-305°C<br>(braun)                                    |
| <u>R<sub>f</sub>-Wert:</u>               |                                                         |                                                         |
| Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) | 0,83                                                    | 0,83                                                    |
| Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)          | 0,69                                                    | 0,68                                                    |
| Isopropanol-Eisessig-Wasser (2+5+5)      | 0,25                                                    | 0,24                                                    |
| <u>UV-Absorptionsspektrum:</u>           | Max <sub>I</sub> = 3705 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2550 Å | Max <sub>I</sub> = 3700 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2550 Å |
| <u>Azetat:</u> Schmelzpunkt              | 187°C                                                   | 186-188°C                                               |

## 2. Isolierung der Flavonglykoside V und W aus den Blüten von Polygonum orientale L. und ihre Identifizierung als Kämpferol-3-rhamnosid und Quercetin-3-rhamnosid

Die Glykoside V und W hatten wir, wie auf Seite 4 beschrieben, durch Ausschüttelung mit Äthylazetat aus dem Blütengesamtextrakt erhalten. Wir waren zu einem Mischkristallisat der beiden Substanzen gelangt, das wir zur Isolierung der einzelnen Glykoside ebenfalls wieder durch präparative Papierchromatographie trennten.

309 mg Mischkristallisat lösten wir in Äthanol und trugen die Lösung auf 30 Bogen Chromatographierpapier Schleicher & Schüll Nr.2043b Gl. auf. Die Entwicklung erfolgte im System Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3). Vor der Analysenquarzlampe markierten wir die beiden Zonen und eluierten die Papierstreifen mit Methanol. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und die Substanz erneut in 70%igem Äthanol aufgenommen. Die filtrierten Lösungen stellten wir im Eisschrank beiseite. Nach 5-8 Tagen hatten sich gelbe kristalline Niederschläge gebildet, die erneut aus Äthanol-Wasser umkristallisiert wurden.

Die Ausbeute betrug 69 mg Glykosid V und 41 mg Glykosid W.

### Substanz V

Wir erhielten 69 mg gelbe Kristallnadeln mit einem Schmelzpunkt von 171-173°C. Die Reduktionsprobe mit Magnesium und Salzsäure <sup>1)</sup> verlief positiv. Der Zirkon-Zitronensäure- <sup>2)</sup> und der Tauböck-Test <sup>3)</sup> bewiesen die Flavonolnatur des Glykosides.

Die Hydrolyse erbrachte als Spaltprodukt ein Aglykon, das wir durch Schmelzpunkt (272-273°C), Mischschmelzpunkt, papierchromatographische Vergleiche, UV-Absorptionsspektrum

---

1) L.HÖRHAMMER u.K.H.MÜLLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharm. Ges. 287/59, 376 (1954)

2) L.HÖRHAMMER u.K.H.MÜLLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharm. Ges. 287/59, 310 (1954)

3) K.TAUBÖCK, Naturwissenschaften 30, 439 (1942)

(s. Abb. 3), Reduktionsspektrum und durch das Azetat (Schmelzpunkt  $183^{\circ}\text{C}$ ) als Kämpferol (3,5,7,4'-Tetraoxyflavon) identifizierten.

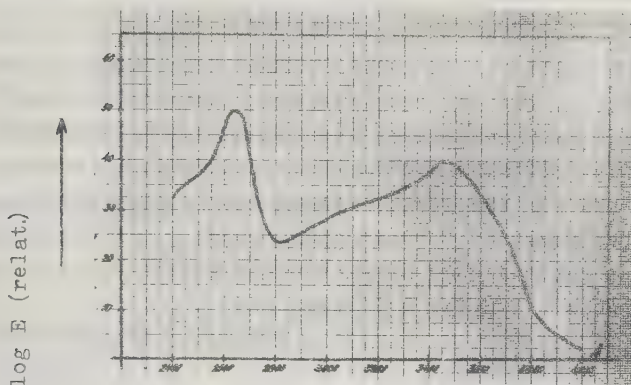


Abb. 3 UV-Absorptionsspektrum von Substanz V  
(Kämpferol-3-rhamnosid)

Der Zucker erwies sich im papierchromatographischen Vergleich mit anderen authentischen Zuckern als Rhamnose. Das Osazon wurde in der üblichen Weise mit Phenylhydrazinhydrochlorid und Natriumazetat hergestellt. Das gelbe kristalline Produkt hatte einen Schmelzpunkt von  $177-179^{\circ}\text{C}$ . Im Mischschmelzpunkt mit authentischem Rhamnose-Osazon erhielten wir keine Depression.

Das Glykosid erwies sich demnach identisch mit dem in der Literatur beschriebenen Kämpferol-3-rhamnosid Afzelin <sup>1)</sup> (Schmelzpunkt  $172-174^{\circ}\text{C}$ ).

Zur Klärung der Zuckerstellung methylierten wir das Glykosid mit Dimethylsulfat. Es entstanden schwer lösliche weisse Kristalle, die wir mit Salzsäure hydrolysierten. Aus dem Hydrolysat fiel zunächst ein gelb gefärbtes Methylprodukt aus, das

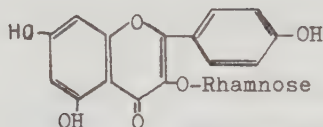
---

1) F.E.KING u.R.M.ACHESON, J.Chem.Soc.(London) 168 (1950)

nach Waschen mit Wasser und zweimaligen Umkristallisieren eine gelblich-weiße Farbe hatte. Die Kristallnadeln schmolzen bei 146-148°C. Dieses Methylderivat stimmte im Schmelzpunkt mit dem 3-Hydroxy-5,7,4'-trimethoxykämpferol überein, das wir durch Totalmethylierung und Hydrolyse von authentischem Kämpferol-3-rhamnosid <sup>1)</sup> erhalten hatten.

F.RICHTHAMMER isolierte im Rahmen seiner Untersuchungen über *Prunus spinosa* L. aus den Blättern ein Kämpferol-3-rhamno-4'-arabinosid. Nach selektiver Abspaltung der am Seitenphenyl gebundenen Arabinose mit dem Hydrolasengemisch Boehringer resultierte ein Kämpferol-3-rhamnosid. Dieser Stoff wurde mit unserer Substanz V verglichen, wobei wir Übereinstimmung in allen analytischen Daten fanden. Substanz V ist demnach identisch mit Kämpferol-3-rhamnosid.

Die Analysenwerte finden sich in Tabelle 3 (s.S.13).



Kämpferol-3-rhamnosid

#### Substanz W

Das Mischkristallisat der Glykoside V und W hatten wir papierchromatographisch getrennt und hierbei sowohl die Substanz V (s.S.10) als auch die Substanz W kristallin erhalten.

Nach mehrfacher Umkristallisation aus 70%igem Äthanol erhielten wir 41 mg hellgelbe Nadeln, die bei 181°C schmolzen.

---

1) F.RICHTHAMMER, Dissertation, Universität München (1956)

T a b e l l e 3

|                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>Schmelzpunkt</u><br><u>R<sub>f</sub>-Werte</u><br>Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3)<br>Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)<br><u>UV-Absorptionsspektrum</u><br><br><u>Methylprodukt Schmelzpunkt</u><br><br><u>Quantitative Hydrolyse</u><br>Einwaage:<br>Aglykon: | <u>Substanz V</u><br>170-173°C<br><br>0,73<br><br>0,78<br><br>Max <sub>I</sub> = 3450 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2640 Å<br><br>146-148°C<br><br>26,00 mg<br>17,80 mg<br>gef. 68,46 %<br>ber. 68,08 % | <u>Kämpferol-3-rhamnosid</u><br>170°C<br><br>0,73<br><br>0,78<br><br>Max <sub>I</sub> = 3450 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2650 Å<br><br>145-147°C<br>3-Hydroxo-5,7,4'-tri-methoxy-kämpferol |
| A g l y k o n<br><br><u>Schmelzpunkt</u><br><u>R<sub>f</sub>-Werte</u><br>Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3)<br>Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)<br>Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (1+2+2)<br><u>UV-Absorptionsspektrum</u><br><br><u>Azetat: Schmelzpunkt</u>     | <u>Aglykon aus Substanz V</u><br>272-273°C<br><br>0,91<br><br>0,76<br><br>0,40<br><br>Max <sub>I</sub> = 3655 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2670 Å<br><br>183°C                                         | <u>Kämpferol (auth.)</u><br>270-274°C<br><br>0,91<br><br>0,78<br><br>0,39<br><br>Max <sub>I</sub> = 3650 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2660 Å<br><br>180-182°C                               |
| Z u c k e r<br><br><u>R<sub>f</sub>-Werte</u><br>Pyridin-Eisessig-Wasser (1+2+2)<br>Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)<br><u>Osazon Schmelzpunkt</u>                                                                                                                        | <u>Zucker aus Substanz V</u><br><br>0,58<br><br>0,27<br><br>177-179°C                                                                                                                              | <u>Rhamnose (auth.)</u><br><br>0,58<br><br>0,26<br><br>178-180°C                                                                                                                        |

Der Reduktionstest mit Magnesium und Salzsäure (rot) deutete ebenso wie der Zirkon-Zitronensäure-Test auf ein Flavonol hin. Chromatographiert wurde im System Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) und Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3). In beiden Systemen stimmte Substanz W mit Querzitrin in der Laufhöhe überein. Beim Besprühen mit Bleiazetat fluoreszierte die Substanz braunorange, mit Aluminiumsulfat gelb. Durch die braunorange Fluoreszenz werden alle Verbindungen gekennzeichnet, die eine freie o-Dihydroxy-Gruppierung im Seitenphenyl aufweisen. Querzitrin zeigte dieselbe Reaktion mit Bleiazetat und Aluminiumchlorid.

Das UV-Absorptionsspektrum des Glykosides wies Maxima bei 3500 Å und 2580 Å auf. Nach der Hydrolyse hatte das zugehörige Aglykon, das im weiteren Verlauf als Querzetin identifiziert wurde, die Maxima 3705 Å bzw. 2550 Å.

S.HATTORI <sup>1)</sup> hatte bei Flavonolen, bei denen das Hydroxyl am C<sub>2</sub> durch Glykosidbindung besetzt ist, eine starke hypsochrome Verschiebung der Bande I gegenüber dem Aglykon gefunden. Verglykosidierungen in Stellung 5,6,7,2',3', ändern dagegen das Absorptionsverhalten der entsprechenden Oxyflavone nicht.

B.SKARZYNSKI <sup>2)</sup> fand, dass auch eine Substitution am C<sub>4</sub>, eine hypsochrome Auswirkung auf die Bande I hat, die allerdings nicht so stark ist, wie bei einem C<sub>3</sub>-Glykosid.

|                                         | <u>Max. I</u> | <sup>+) </sup> |
|-----------------------------------------|---------------|----------------|
| Querzetin                               | 3705 Å        |                |
| Querzetin-4'-Glukosid<br>(Spiraeosid)   | 3660 Å        | (- 45 Å)       |
| Querzetin-3-Glukosid<br>(Isoquerzitrin) | 3560 Å        | (- 145 Å)      |
| Querzetin-3-rhamnosid<br>(Querzitrin)   | 3550 Å        | (- 155 Å)      |

1) S.HATTORI, Acta Phytochim. (Tokyo), 4, 27 (1925)

2) B.SKARZYNSKI, Biochem.Z. 301, 150 (1939)

<sup>+)</sup>  Verschiebung nach kurzen Wellen

Vergleicht man diese Angaben mit unseren UV-Messergebnissen, so würde dies heissen, dass bei Substanz W eine Verglykosidierung am C<sub>3</sub> vorliegt, was in Übereinstimmung mit dem Zirkon-Zitronensäure-Test steht.

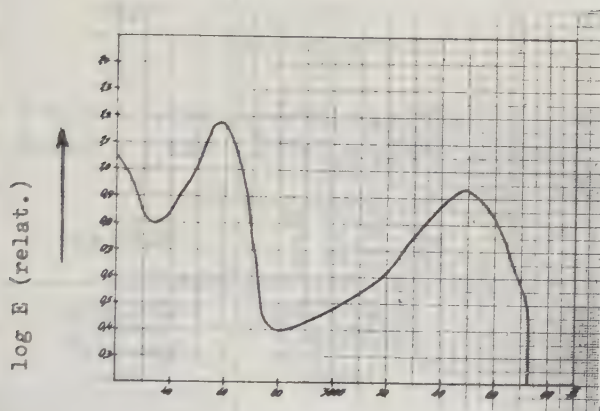
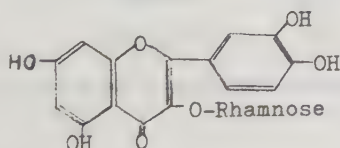


Abb.4 UV-Absorptionsspektrum von Substanz W  
(Querzetin-3-rhamnos.)

Der Nachweis des Aglykons als Querzetin erfolgte durch Schmelzpunkt und Darstellung des Pentaazetylquerzetins und durch den papierchromatographischen Vergleich mit authentischem Querzetin.

Als Zucker wurde Rhamnose papierchromatographisch nachgewiesen (s.Tab.4). Das Osazon hatte einen Schmelzpunkt von 177-179°C. (Osazon aus authentischer Rhamnose 177-179°C.) Somit konnten wir Substanz W als Querzetin-3-rhamnosid identifizieren. Die Analysenwerte sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.



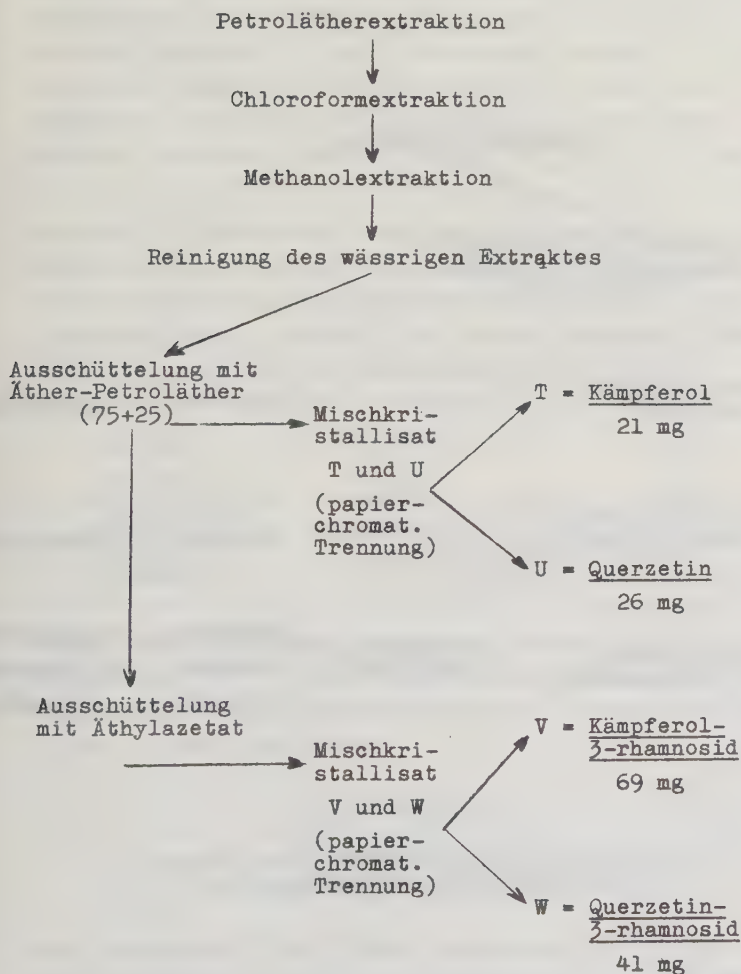
Querzetin-3-rhamnosid

T a b e l l e 4

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>Schmelzpunkt</u><br><u>R<sub>f</sub>-Werte</u><br>Äthylazetat-Ameisen-<br>säure-Wasser (10+2+3)<br>Butanol-Eisessig-<br>Wasser (4+1+5)<br><u>UV-Absorptionsspektrum</u><br><br><u>Quantitative Hydrolyse</u><br>Einwaage:<br>Aglykon:                                                          | <u>Glykosid W</u><br>181°C<br><br>0,67<br>0,73<br>Max <sub>I</sub> = 3540 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2580 Å<br><br>15,73 mg<br>gef. 67,57 %<br>ber. 67,40 %     | <u>Querzetin-3-<br/>rhamnosid(auth.)</u><br>181-183°C<br><br>0,67<br>0,75<br>Max <sub>I</sub> = 3550 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2560 Å<br><br>(10,63 mg)       |
| <u>Aglykon aus Glykosid W</u><br><u>Schmelzpunkt</u><br><br><u>R<sub>f</sub>-Werte</u><br>Äthylazetat-Ameisen-<br>säure-Wasser (10+2+3)<br>Butanol-Eisessig-<br>Wasser (4+1+5)<br>Isopropanol-Ameisen-<br>säure-Wasser (2+1+5)<br><u>UV-Absorptionsspektrum</u><br><br><u>Azetat Schmelzpunkt</u> | <u>Aglykon aus<br/>Glykosid W</u><br>295-306°C<br>(braun)<br><br>0,82<br>0,69<br>0,25<br>Max <sub>I</sub> = 3705 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2550 Å<br><br>188°C | <u>Querzetin<br/>(auth.)</u><br>298-305°C<br>(braun)<br><br>0,83<br>0,69<br>0,24<br>Max <sub>I</sub> = 3700 Å<br>Max <sub>II</sub> = 2550 Å<br><br>186-188°C |
| <u>Zucker aus Glykosid W</u><br><br><u>R<sub>f</sub>-Werte</u><br>Pyridin-Eisessig-<br>Wasser (1+2+2)<br>Butanol-Eisessig-<br>Wasser (4+1+2)<br><u>Osazon Schmelzpunkt</u>                                                                                                                        | <u>Zucker aus<br/>Glykosid W</u><br><br>0,58<br>0,27<br>177-179°C                                                                                             | <u>Rhamnose<br/>(auth.)</u><br><br>0,58<br>0,26<br>177-179°C                                                                                                 |

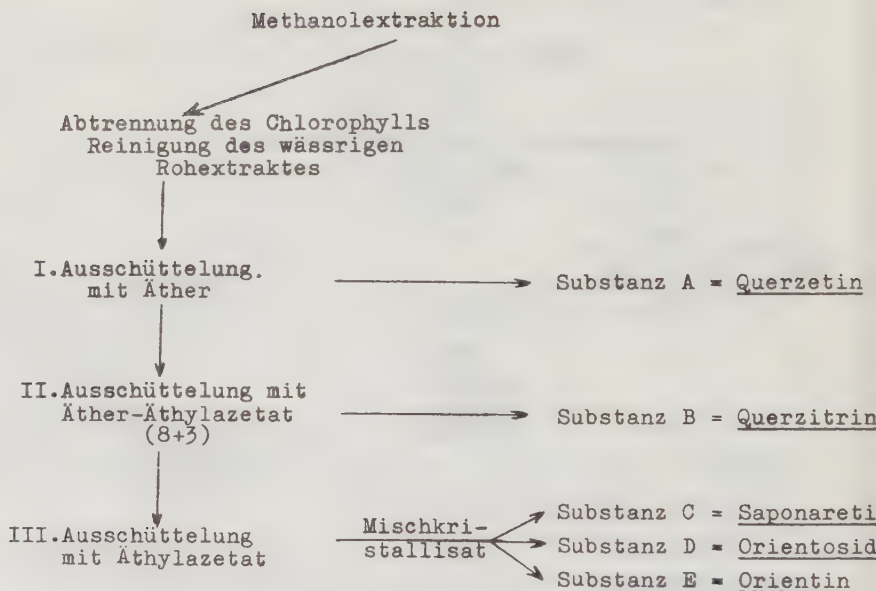
I s o l i e r u n g s s c h e m a

für die Flavone aus den B l ü t e n  
von Polygonum orientale L.



I s o l i e r u n g s s c h e m a

für die Flavone aus den B l ä t t e r n  
von Polygonum orientale L.



Trennung des Mischkristallisates durch  
präparative Papierchromatographie

### 3. Isolierung der Nebenflavone aus den Blättern von Polygonum orientale L.

Die Blätter von Polygonum orientale enthalten wie bereits eingangs erwähnt 5 Flavonoide. Die Hauptglykoside Orientosid und Orientin wurden von F.GLOGGENGIESSEP isoliert und beschrieben. Wir beschäftigten uns mit den Nebenflavonen, die als Substanz A, B und C bezeichnet wurden. Substanz A stimmte  $R_f$ -mässig mit dem aus Blüten isolierten Quercetin, Substanz B mit dem ebenfalls dort isolierten Quercitrin überein. Substanz C wurde dagegen nur in den Blättern gefunden.

Die frisch getrockneten und zerkleinerten Blätter von Polygonum orientale L. extrahierten wir mit Methanol, reinigten den Rohextrakt von Ballaststoffen und fertigten ein Papierchromatogramm an, das mit Äthylacetat-Essigester-Wasser (10+2+3) entwickelt folgendes Flavonbild ergab:

| <u>Flavon:</u> | <u><math>R_f</math>-Wert:</u> |
|----------------|-------------------------------|
| Substanz A     | 0,80                          |
| Substanz B     | 0,67                          |
| Substanz C     | 0,51                          |
| Substanz D     | 0,37 (Orientosid)             |
| Substanz E     | 0,31 (Orientin)               |

Durch fraktionierte Ausschüttelung mit Äther (I) und Äther-Äthylacetat (8+3) (II) und Äthylacetat (III) (siehe Isolierungsschema) konnten wir das Gemisch in drei Fraktionen einteilen. Diese enthielten:

- I. Substanz A
- II. Substanz B
- III. Substanz C, D, E.

Die Substanzen A und B lagen also getrennt vor. Wir konnten beide Stoffe aus Äthanol zur Kristallisation bringen. Aus Fraktion III erhielten wir ein Mischkristallisat der Substanzen C, D und E.

### Substanz A

Die Ausbeute betrug 150 mg hellgelbe Kristalle, die einen Schmelzpunkt von 305°C hatten.

Das Absorptionsspektrum entsprach dem Querzetin in der Lage der beiden Banden ( $\text{Max}_I = 3605 \text{ \AA}$ ,  $\text{Max}_{II} = 2550 \text{ \AA}$ ). Papierchromatographisch stimmte die Substanz in mehreren Lösungsmitteln mit Querzetin überein (s.Tab.5).

T a b e l l e 5

| Lösungsmittelsysteme                     | Substanz A           | Querzetin            |
|------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|                                          | R <sub>F</sub> -Wert | R <sub>F</sub> -Wert |
| Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+1+3) | 0,80                 | 0,82                 |
| Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)          | 0,69                 | 0,68                 |
| Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)  | 0,24                 | 0,24                 |

Das Azetylderivat stellten wir durch 1-stündiges Kochen des Aglykons mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat her. Es hatte nach zweimaliger Umkristallisation aus Methanol einen Schmelzpunkt von 187°C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Pentaazetylquerzetin zeigte keine Depression.

### Substanz B

Wir erhielten 275 mg hellgelbe Kristallnadeln, deren Schmelzpunkt bei 181°C lag. Beim Mischschmelzpunkt mit Querzetin-3-rhamnosid beobachteten wir keine Depression (181-183°C). Papierchromatographisch verglichen wir die Substanz in folgenden Systemen mit Querzetin-3-rhamnosid (s.Tab.6):

T a b e l l e 6

| Lösungsmittelsysteme                          | Substanz B           | <u>Querzetin-<br/>3-rhamnosid</u> |
|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
|                                               | R <sub>f</sub> -Wert | R <sub>f</sub> -Wert              |
| Butanol-Eisessig-<br>Wasser (4+1+5)           | 0,71                 | 0,73                              |
| Äthylazetat-Ameisen-<br>säure-Wasser (10+2+3) | 0,67                 | 0,67                              |

Beim Besprühen mit Aluminium- und Blei-Salzlösungen stimmten die Farbreaktionen mit der Testsubstanz überein.

Das Absorptionsspektrum des Glykosides war durch Maxima bei 3550 Å und bei 2560 Å gekennzeichnet.

Nach Konstantttrocknung hydrolysierten wir 27,1 mg des Glykosides mit 1 % Salzsäure und erhielten 18,5 mg (ber. 18,3 mg) Querzetin. Dieses entspricht einem Aglykongehalt von 68,28 %, der für ein Monorhamnosid erwartet wird.

Das Aglykon wurde als Querzetin nachgewiesen mittels Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt (302-305°C), Absorptionsmessung (Max<sub>I</sub> = 3700 Å, Max<sub>II</sub> = 2550 Å) und durch sein papierchromatographisches Verhalten in verschiedenen Lösungsmitteln (s.Tab.7).

T a b e l l e 7

| Lösungsmittelsysteme                          | Substanz B           | <u>Querzetin<br/>(auth.)</u> |
|-----------------------------------------------|----------------------|------------------------------|
|                                               | R <sub>f</sub> -Wert | R <sub>f</sub> -Wert         |
| Butanol-Eisessig-<br>Wasser (4+1+5)           | 0,69                 | 0,68                         |
| Äthylazetat-Ameisen-<br>säure-Wasser (10+2+3) | 0,80                 | 0,82                         |
| Isopropanol-Ameisen-<br>säure-Wasser (2+5+5)  | 0,24                 | 0,24                         |

Das aus dem Aglykon hergestellte Azetat hatte denselben Schmelzpunkt wie das authentischen Querzetinpentaazetyl-derivat (186-188°C). Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression. Der Zucker aus Glykosid B wurde papierchromatographisch als Rhamnose nachgewiesen. Folgende Lösungsmittelsysteme wurden benutzt:

- I. Picolin-Ammoniak-Wasser (70+2+28)
- II. Butanol-Eisessig-Wasser (40+10+50)

T a b e l l e 8

|                       | R <sub>F</sub> -Wert I | R <sub>F</sub> -Wert II |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| Glukose authentisch   | 0,16                   | 0,14                    |
| Rhamnose authentisch  | 0,40                   | 0,34                    |
| Zucker aus B          | 0,41                   | 0,34                    |
| Galaktose authentisch | 0,18                   | 0,13                    |

Die weitere Identifizierung erfolgte durch die Darstellung des Osazons. Das erhaltene Kristallinat hatte einen Schmelzpunkt von 177-179°C, der mit auth. Rhamnoseosazon auch im Mischschmelzpunkt (178-180°C) übereinstimmte.

Der Ort der Zuckersubstitution musste am C<sub>3</sub> angenommen werden. Hierfür sprach das UV-Absorptionsspektrum (s.S.15) und die Ergebnisse des Zirkon-Zitronensäure-Tests.

Auf dem Papier wurde der gelbe Zirkonkomplex beim Besprühen mit Zitronensäure gelöscht. Nach Behandlung mit konzentrierter Salzsäure trat die gelbe Fluoreszenz wieder auf. Das leicht spaltbare C<sub>3</sub>-Glykosid war zu gelb gefärbtem Flavonol hydrolysiert worden.

Damit konnten wir Glykosid B aus den Blättern von Polygonum orientale L. eindeutig als Querzetin-3-rhamnosid identifizieren.

### Substanz C

Nach der fraktionierten Ausschüttelung der beiden Substanzen A und B, die wir im vorherigen Teil als Querzetin und Querzetin-3-rhamnosid identifiziert hatten, lagen in der nächsten Fraktion (siehe Isolierungsschema S.18) die Stoffe C, D und E vor. Versuche, die Trennung dieser drei Substanzen durch fraktionierte Ausschüttelung mit Lösungsmittelgemischen zu erreichen, hatten keinen Erfolg, da sich die Systeme als zu wenig selektiv erwiesen.

Die papierchromatographische Untersuchung ergab, dass in dem Substanzgemisch die Substanzen D und E erheblich überwogen. Substanz D ist identisch mit Orientosid, Substanz E mit Orientin.

Wir bedienten uns zur Gewinnung der Substanz C der präparativen Papierchromatographie. Aus 200 Bögen Chromatographierpapier erhielten wir ein hoch konzentriertes Methanoleluat, aus dem die Kristallisation der Substanz C jedoch nicht gelang. Unsere Untersuchungen wurden mit der alkoholischen Lösung der Substanz vorgenommen.

### Nachweis funktioneller Gruppen durch Farbreaktionen

Bei der Reduktionsprobe nach R.WILLSTÄTTER und H.MALLISON <sup>1)</sup> erhielten wir ein für Flavone typisches rot gefärbtes Reduktionsprodukt. Während der Tauböck-Test <sup>2)</sup> durch seinen positiven Ausfall das Vorliegen einer 4-keto-3-oxy- bzw. einer 4-keto-5-oxy-Gruppierung anzeigte, konnten wir durch den Zirkon-Zitronensäure-Test <sup>3)</sup> feststellen, dass nur am C<sub>5</sub> eine freie OH-Gruppe vorhanden ist, womit das Vorliegen eines Flavons ohne Hydroxylgruppe am C<sub>3</sub> wahrscheinlich wurde.

---

1) R.WILLSTÄTTER und H.MALLISON, S.-B.preuss.Akad.Wiss. phys.-math.Kl. 769 (1914)

2) K.TAUBÖCK, Naturwissenschaften 30, 439 (1942)

3) L.HÖRHAMMER u.R.HÄNSEL, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharm. Ges. 284, 276 (1951)

In der gleichen Richtung deutete die Grünfärbung mit Eisenchlorid nach L.H.BRIGGS und R.H.LOCKER <sup>1)</sup>).

#### Farbreaktionen auf dem Papierchromatogramm

Unbesprüht erschien der Chromatogrammfleck von Substanz C im UV-Licht als nicht fluoreszierender braunschwarzer Fleck. Beim Besprühen traten folgende Farben auf:

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 5 % Aluminiumsulfatlösung             | gelb-grün |
| Bes. Bleiazetatlösung DAB 6           | gelb-grün |
| Lösung von Echtblausalz <sup>*)</sup> | rotbraun  |

Die Gelbfärbung mit Aluminiumchlorid kennzeichnet Substanz C ebenfalls als Flavon. Die Farbe des Bleikomplexes gibt uns Aufschluss über die Substitutionsverhältnisse im Seitenphenyl. Flavone mit einer freien o-Dihydroxy-Gruppe ergeben immer eine braun-orange Fluoreszenz. Die gelbe Farbe des Bleikomplexes von Substanz C zeigt, dass eine solche Gruppierung im Seitenphenyl nicht vorliegt.

Nach R.NEU <sup>2)3)</sup> bleiben mit Echtblausalzlösung nur die am C<sub>7</sub> verglykosidierten Flavone ungefärbt. Wir können daher annehmen, dass Substanz C ein freies C<sub>7</sub>-Hydroxyl besitzt.

Diese Farbreaktionen stimmten mit denen des Orientosids, das F.GLOGGENGIESSER aus derselben Pflanze isoliert hatte, völlig überein. Auch die Maxima des UV-Absorptionsspektrums (s.Abb.5, S.25) lagen im Bereich der Orientosid-Maxima (Max<sub>I</sub> = 3330 Å, Max<sub>II</sub> = 2710 Å). Der Unterschied beider Substanzen bestand daher nur im  $\lambda_f$ -Wert. (Orientosid 0,37, Substanz C 0,51 - Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser 10+2+3.)

---

1) L.H.BRIGGS u.R.H.LOCKER, J.Chem.Soc. (London) 5133 (1951)

2) R.NEU, Z.analyt. Chem. 151, 321 (1956)

3) R.NEU, Mikrochim.Aceta, 196 (1957)

<sup>\*)</sup> nach R.NEU: 0,3%ige wässrige Lösung von tetraazotiertem Di-o-anisidin.

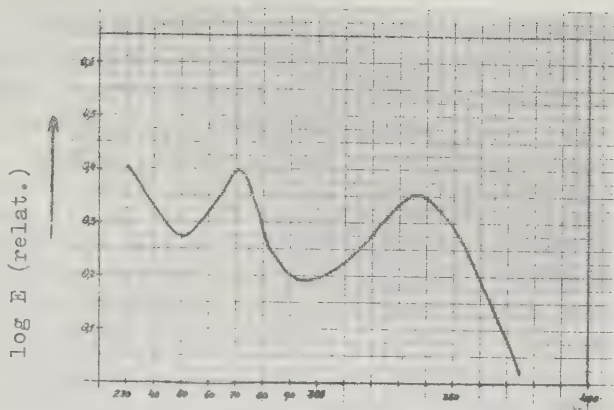


Abb.5 UV-Absorptionsspektrum von Substanz C  
in äthanolischer Lösung

$$\text{Max}_{\text{I}} = 3360 \text{ Å}$$

$$\text{Max}_{\text{II}} = 2710 \text{ Å}$$

#### 4. Weitere Versuche zur Identifizierung von Substanz C und Orientosid

Die Ergebnisse der Papierchromatographie (Fluoreszenz,  $R_f$ -Wert) liessen vermuten, dass in Substanz C ein Glykosid vorliegt. Es überraschte daher, dass durch die üblichen Hydrolysemethoden mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure keine Spaltung zu erreichen war. Weder die Erhöhung der Versuchsdauer, noch der Säurekonzentration hatten auf die Spaltbarkeit der Substanz einen Einfluss. Das von C.MANNICH und G.SIEWERT <sup>1)</sup> beschriebene Hydrolyseverfahren mit salzsauerm Azeton zeigte ebenfalls keinen Erfolg.

Auch F.GLOGGEGIESSLER <sup>2)</sup> war es damals unter den gleichen

<sup>1)</sup> C.MANNICH u.G.SIEWERT, Ber. 75, 737 (1942)

<sup>2)</sup> F.GLOGGEGIESSLER, Dissertation, Universität München (1957)

Bedingungen nicht gelungen, die beiden aus derselben Pflanze isolierten Substanzen Orientosid und Orientin zu spalten. Erst durch eine neue Hydrolysenmethode mit schwefelsaurem Äthylenglykol (von H.R. ARTHUR und Mitarbeitern <sup>1)</sup>) gelangte er erstmals zu geringen papierchromatographisch nachweisbaren Aglykonmengen (Apigenin und Lateolin), während aber der Nachweis eines Zuckers auch dann noch nicht gelang.

Schon die Farbreaktion und das UV-Spektrum hatten gezeigt, dass zwischen Substanz C und dem Apigenin-"Glykosid" Orientosid gewisse Beziehungen bestehen. Beide Substanzen gehören in die Stoffklasse der Flavone im engeren Sinne und lassen sich mit den herkömmlichen Mitteln nicht hydrolysieren. Es lag daher nahe, die weiteren Untersuchungen mit den beiden Substanzen gemeinsam vorzunehmen. Wir hofften so einerseits die Ergebnisse von F. ZLOGGENIESSER über Orientosid zu vervollständigen, andererseits wertvolle Hinweise über die Natur der Substanz C und Anhaltspunkte für die Identifizierung des Lateolinderivates Orientin zu erhalten.

#### a) KILIANI-Hydrolyse von Substanz C

Bei der Identifizierung von herzwirksamen Glykosiden der Digitalisreihe hatte H. KILIANI <sup>2)</sup> eine ähnlich schwere Hydrolysierbarkeit von einigen Glykosiden vorgefunden. Die hydrolytische Spaltung war ihm aber schliesslich durch längeres Kochen der Substanzen in einer Mischung von 55 ml Eisessig, 55 ml Wasser und 10 ml Salzsäure (37%ig) gelungen.

Wir unterwarfen zunächst Substanz C den Bedingungen der KILIANI-Hydrolyse. Das Hydrolysat wurde mit Äthylazetat ausgeschüttelt, um nicht nur Spaltprodukte, sondern auch die eventuelle unveränderte oder nur teilweise gespaltene

---

1) H.R. ARTHUR u. J. K. M. A. J. N. MA, J. Chem. Soc. (London), 632 (1956)

2) H. KILIANI, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 63/2, 2300 (1936)

Ausgangssubstanz zu erhalten.

Zur Ermittlung der Spaltprodukte wurden die Flavonauausschüttelungen chromatographiert. Die Hydrolysenflüssigkeit neutralisierten wir durch Ionenaustauscher Dowex 2 und konzentrierten sie zur Identifizierung des Zuckers auf etwa 3 ml.

Neben der unveränderten Ausgangssubstanz ( $R_f$ -Wert 0,49) fanden wir papierchromatographisch einen neu aufgetretenen Fleck auf der Höhe des Apigenins ( $R_f$ -Wert 0,86) und einen schwachen Fleck unterhalb ( $R_f$ -Wert 0,35) der Ausgangssubstanz, der in der Laufhöhe mit Orientosid übereinstimmte (Lösungsmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)).

Bei der "Hydrolyse" wurde also die interessante Beobachtung gemacht, dass neben der Aufspaltung in ein Aglykon (Apigenin) offenbar auch eine Umlagerung von Substanz C in das Orientosid stattgefunden hatte (s. Abb. 6, S. 29). Wenn aber Orientosid bei der Säureeinwirkung auf Substanz C entstanden war, musste es umgekehrt möglich sein, auch das Orientosid in Substanz C überzuführen.

#### b) KILIANI-Hydrolyse von Orientosid

Die papierchromatographische Untersuchung der Hydrolysen-Ausschüttelung nach der KILIANI-Hydrolyse ergab tatsächlich neben unverändertem Orientosid zwei neue Flecke, von denen der eine auf der Höhe des Apigenins (I) und der andere wiederum auf der Höhe der Substanz (II) war.

Zur genaueren Kennzeichnung dieser Stoffe wurden sie mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie getrennt, die ausgeschnittenen Zonen mit Methanol eluiert und die Eluate zur vergleichenden Papierchromatographie (s. Tab. 9, S. 28) sowie zur Messung der UV-Absorptionsspektren benutzt.

T a b e l l e 9

| Lösungsmittelsysteme                     | Zone I<br>R <sub>f</sub> -Wert | Apigenin<br>R <sub>f</sub> -Wert | Zone II<br>R <sub>f</sub> -Wert | Substanz C<br>R <sub>f</sub> -Wert |
|------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)          | 0,86                           | 0,86                             | 0,49                            | 0,49                               |
| Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) | 0,92                           | 0,92                             | 0,51                            | 0,51                               |
| Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)  | 0,52                           | 0,52                             | 0,73                            | 0,73                               |

T a b e l l e 10

UV-Absorptionsspektrum der Hydrolyseprodukte von Orientosid

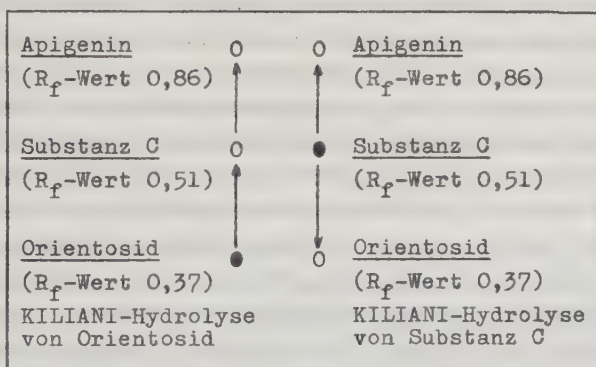
|            | Max. I | Max. II |
|------------|--------|---------|
| Zone I     | 338    | 265     |
| Apigenin   | 338    | 269     |
| Zone II    | 334    | 272     |
| Substanz C | 336    | 271     |
| Orientosid | 333    | 271     |

Vergleicht man die in Tabelle 9 zusammengefassten Ergebnisse mit den bei der Hydrolyse von Substanz C gemachten Beobachtungen, so ergibt sich hieraus eine strukturelle Verwandtschaft für beide Stoffe. Da sie unter Säureeinwirkung teilweise ineinander umwandelbar waren, dachten wir an das Vorliegen von Strukturisomeren. Wenn man hierfür die R<sub>f</sub>-Differenz in Betracht zieht, so wäre der Gedanke an einen hydroxylhaltigen Rest, der je nach den gewählten Bedingungen einmal als Kette, ein andermal zum Ring geschlossen, vorliegt, naheliegend.

Wenn diese Annahme richtig war, musste es nunmehr auch möglich sein durch Abänderung der "Hydrolyse"-Bedingungen zu

einer Verschiebung des Isomeriegleichgewichtes zu kommen bzw. die Bedingungen herauszufinden, unter denen eine Umlagerung resp. eine Ringöffnung bzw. eine Ringschluss stattfindet.

A b b i l d u n g 6



### c) Enzym-Hydrolyse

Zur Beweisführung wählten wir die Enzym-Hydrolyse. In einer Versuchsreihe liessen wir Autolysate aus unter- und obergäriger Bierhefe, Hydrolasengemisch <sup>+</sup>) sowie Anthococyaninase B <sup>++</sup>) auf Substanz C und Orientosid einwirken.

Bei beiden Substanzen (Substanz C und Orientosid) konnten wir nur nach Behandlung mit Leberemulsion Veränderungen beobachten. Das hierbei in sehr geringen Mengen erhaltene Spaltstück erwies sich in beiden Fällen papier-

<sup>+</sup>) Hydrolasengemisch aus Aspergillus-Arten der Fa. BOEHRINGER & SÖHNE, Mannheim.

<sup>++</sup>) der Fa. ROHM & HAAS, Comp. Philadelphia 5, Pennsylvania (USA)

chromatographisch als Apigenin. Eine Umlagerung von Orientosid in Substanz C und umgekehrt, wie wir es bei KILIANI-Hydrolyse beobachtet hatten, konnten wir hier nicht feststellen. Damit war eine gewisse Bestätigung für die obige Vermutung gegeben.

#### d) Untersuchung auf Zucker

Versuche, in der Hydrolyse-Lösung eventuell abgespaltene Zucker nachzuweisen, erfolgten in der üblichen Weise durch Papierchromatographie. Beim Besprühen mit Anilinphthalat-Lösung erschienen die Vergleichszucker als braune Flecke, während die neutralisierte Lösung erst nach längerem Erhitzen im Trockenschrank bei  $210^{\circ}\text{C}$  einen dunkelbraunen Fleck in Höhe von  $R_F = 0,65$  (in Pyridin-Äthylazetat-Wasser (1+2+2)) und  $R_F = 0,19$  (in Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)) lieferte. In seinem  $R_F$ -Wert bestand keine Gleichheit mit einer der bekannten Hexosen und Pentosen. Die FEHLINGSche Probe verlief ebenso wie der Versuch, ein Osazon darzustellen, negativ. Da bei mehrmaliger Wiederholung des ersten Versuches die anfangs beobachteten Erscheinungen nicht immer reproduziert werden konnten, musste die Frage, ob ein Zucker abgespalten worden war, offen bleiben. Damit war aber gleichzeitig unsicher geworden, ob Orientosid noch als ein typisches Flavonglykosid anzusprechen war.

#### e) Azetylierung

Als weiteren Schritt versuchten wir eine nochmalige Azetylierung des Orientosids. Das mit Natriumazetat und Essigsäureanhydrid hergestellte Azetat blieb - ebenso wie bei den Versuchen F.GLOGGENGIESSERS - auch nach mehreren Reinigungsversuchen amorph, es war aber, wie ein papierchromatographischer Test zeigte, einheitlich. Eine orientierende CH-, Azetylgruppen- und Molekulargewichtsbestimmung lieferte folgende Werte:

|                                                                   |          |          |                              |
|-------------------------------------------------------------------|----------|----------|------------------------------|
| Orientosidazetat                                                  | C 57,40% | H 4,86 % | CH <sub>3</sub> CO - 42,33 % |
| für Heptaazetat                                                   | C 57,90% | H 4,70 % | CH <sub>3</sub> CO - 41,50 % |
| C <sub>21</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> (OAc) <sub>7</sub> |          |          |                              |

Das Molekulargewicht des Orientosidazetats betrug 624.

Berechnet auf dieses Molekulargewicht würde dies bedeuten, dass das Orientosidmolekül insgesamt 7 OH-Gruppen enthält. Nachdem Apigenin nur drei phenolische Gruppen besitzt, verbleiben für den "Zuckerrest" oder einen anderen hydroxylhaltigen Rest noch vier OH-Gruppen, was mit der Höhe des Molekulargewichtes gut übereinstimmen würde. Somit war der am Apigeninmolekül hängende Rest grössenordnungsmässig festgelegt. Unter Zugrundelegung des Acetylproduktes errechnete sich hierfür ein Wert von M = 164.

F.GLOGGENGIESSER hatte das Orientosid und Orientin als Apigenin- bzw. Luteolinglykosid angesprochen und hierfür neben den IR- und UV-spektrophotometrischen Messungen als besonders gutes Beweismittel die Tatsache angeführt, dass ihm eine wenn auch schwache Hydrolyse mit schwefelsaurem Äthylenglykol<sup>1)</sup> gelungen war. Sowohl die positiv verlaufende KILIANI-Hydrolyse, wie auch die Veränderungen nach der Leberemulsin-Spaltung schienen ihm erneut Recht zu geben. Trotzdem waren die erreichten Hydrolyseneffekte in allen Fällen bescheiden. Ohne noch greifbare Argumente gegen die Glykosidverknüpfung zu besitzen, machten wir für unsere weiteren Versuche die Möglichkeit einer C-C-Bindung zur Voraussetzung. C-C-Bindungen sind in der Flavonreihe bisher noch nicht beschrieben und unseres Wissens ist bis heute unter den Naturstoffen auch nur ein Fall bekannt geworden, bei dem ein Zucker über eine C-C-Bindung an ein Aglykon geknüpft ist. So konnte H.MÜHLEMAN<sup>2)</sup> beweisen, dass das Aloin nicht das Glykosid des Aloeemodinanthrons darstellt, sondern die Struktur eines 10 (1'5'-Anhydroglukosyl)-Aloeemodin-9-anthrone besitzt. Auch das Aloin erwies

1) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)

2) H.MÜHLEMAN, Pharm.Acta Helv. 27, 17 (1952)

sich mit Säure nicht spaltbar. Aus ihm gelang es nur, durch Lauge oder Chromsäureoxydation das freie Emodin bzw. Rhein zu isolieren. Die gleiche Spaltung der C-C-Bindung war auch mit Hilfe von Eisen-3-chlorid möglich, eine Methode, die man sich bei der quantitativen Bestimmung des Alois zunutze gemacht hat <sup>1)</sup>.

Bei einem Versuch, auch das Orientosid mit  $\text{FeCl}_3$  oxydativ aufzuspalten, konnten wir papierchromatographisch neben unverändertem Orientosid in der Ätherausschüttelung deutlich das Apigenin nachweisen. Die Ausbeute an Aglykon war verglichen mit den Resultaten der KILLIANI-Hydrolyse diesmal bedeutend höher, wenn auch in keinem Falle quantitativ. Wenig Erfolg brachte hingegen die Chromsäuremethode. Sie führte in nicht reproduzierbaren Reaktionen neben einer geringen Aufspaltung zu einer teilweisen Zerstörung der Substanz.

An weiteren Methoden einer C-C-Spaltung blieb nur noch die Hydrogenolyse. Diese besteht in dem Eintritt von Wasserstoff in ein Molekül ohne gleichzeitige Abspaltung von Wasser. Sie verlangt im allgemeinen ziemlich hohe Temperaturen, gelingt aber bei Verwendung von Katalysatoren in Spezialfällen auch unter wesentlich mildereren Bedingungen. Während beispielsweise für die Hydrogenolyse von Alkoholen <sup>2)</sup> 5-stündiges Erhitzen bei 100-200 atü mit Einsatz von Mischkatalysatoren, bei Diphenyläthern <sup>3)</sup> 100-120 atü und 100-150°C erforderlich sind, konnten A.STOLL <sup>4)</sup> das Sennidin bzw. das Sennosid bei normalen Temperaturen mit Nickel als Katalysator zum Rheinanthron bzw. Anthranol spalten. In diesem Zusammenhang erwähnt sei auch die C-C-Hydrogenolyse von Lupulon und Humulon <sup>5)</sup>.

---

1) H.AUTERHOF u.B.BALL, Arzneimittelforschung 4, 725 (1954)

2) HOUBEN-WEYL, Methoden der Organischen Chemie, Stuttgart, 1955, Bd.IV/2, S.316

3) ibid. S.313

4) A.STOLL, B.BECKER u.A.HELFFENSTEIN, Helv.Chimic.Acta 33, 313 (1950)

5) W.RIEDL u. J.NICKL, Chem.Ber. 89, 1838 (1956)

Die Hydrogenolyse, bei der Wasserstoff unter Spaltung einer Bindung in eine Molekel eintritt, ist nur eine Gruppe von katalytischen Hydrierungsreaktionen. Die zweite Gruppe umfasst die Anlagerungsreaktionen von Wasserstoff an ungesättigte Systeme. Da auch die Möglichkeit bestand, dass im Seitenrest eine C=C-Doppelbindung vorhanden war, wählten wir die für Anlagerungsreaktionen üblichen milden Bedingungen.

Hydriert wurde in einer von C.WEYGAND und A.WERNER <sup>1)</sup> beschriebenen Apparatur unter Verwendung von Platinoxid als Katalysator bei normaler Temperatur. An Vergleichssubstanzen wurde unter den gleichen Bedingungen Zimtsäure und Rutin mithydriert. Während Rutin einen durchschnittlichen Wasserstoffverbrauch von 0,39 ml hatte, betrug er für das Orientosid 1,275 ml. Da die Flavone infolge ihrer C=O-Gruppe und der phenolischen OH-Gruppen Anlass zu Nebenreaktionen geben können, liess sich aus dem Wasserstoffverbrauch beim Orientosid nur folgern, dass an irgendeiner Stelle des Moleküls eine zusätzliche Wasserstoffanlagerung erfolgt sein dürfte.

Den entsprechenden Hinweis lieferte eine papierchromatographische Untersuchung. In der Hydrierlösung konnten wir diesmal fast nur noch freies Apigenin nachweisen, ein Befund, der wiederum für das Vorliegen einer C-C-Bindung sprach. Um nunmehr Anhaltspunkte für die Natur des Seitenrestes zu erhalten, versuchten wir eine Oxydation mit Perjodsäure.

#### d) Perjodsäure-Oxydation

Diese Methode führt im allgemeinen bei Polyalkoholen <sup>2)</sup> zu Formaldehyd und Ameisensäure, obwohl namentlich bei Glykosiden und Kohlenhydraten mancherlei Nebenreaktionen möglich sind. Zur Durchführung wählten wir, da uns nur

---

1) C.WEYGAND u. A.WERNER, J.prakt.Chem. 149, 330 (1937)

2) HOUBEN-WEYL, Methoden der Organischen Chemie, Stuttgart, (1953), Bd.II, S.360

noch wenig Substanz zur Verfügung stand, eine von M.VISCONTINI, D.HOCH und P.KARRER <sup>1)</sup> zum Nachweis der Ringstruktur von Zuckern bei Nucleosiden verwendete Mikromethode. Die Methode beruht auf der Reduktion des bei der Oxydation entstandenen Dialdehyds mit Natriumborhydrid und anschliessenden Hydrolyse mit Salzsäure. Die freigewordenen Alkohole werden dann papierchromatographisch nach Besprühen mit Natriumperjodatlösung und Benzidinlösung nachgewiesen. Die Methode ist sehr empfindlich und lässt sich allgemein auf Alkohole mit vicinalen OH-Gruppen anwenden. Um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Methode für unsere Zwecke zu prüfen, wurden neben Orientosid auch die Flavonglykoside Rutin und Scutellarin, sowie Saccharose den obigen Reaktionen unterworfen. Bei der Chromatographie des Reaktionsgemisches konnten wir bei Rutin, Scutellarin und Saccharose das erwartete Spaltprodukt Glycerin finden, während bei Orientosid weder Glycerin noch ein anderer Polyalkohol - Äthylenglykol - papierchromatographisch nachzuweisen war. Dies zeigte erneut, dass der "Rest" des Orientosids nicht den Zuckerkomponenten der üblichen Flavonglykoside entsprach und sehr wahrscheinlich auch keine vicinalen OH-Gruppen enthielt. Weitere Oxydationsversuche nach anderen Methoden waren aus Substanzmangel nicht mehr durchführbar.

---

1) M.VISCONTINI, D.HOCH u. P.KARRER, *Helv.Chim.Acta* 38, 642 (1955)

Zusammenfassung der aus den bisherigen Untersuchungen über  
Orientosid und Substanz C resultierenden Ergebnisse

1. Beide Substanzen sind Apigenin-Derivate.
2. Sie tragen einen unbekannten, hydrophilen Rest, der schwer "hydrolysierbar" ist, und können
3. gegenseitig ineinander überführt werden.
4. Dieser Rest ist vermutlich über eine C-C-Bindung mit dem Grundgerüst (Apigenin) verbunden.
5. Für den Seitenrest errechnet sich aus den Azetylgruppen- und Molekulargewichtsbestimmungen ein Wert von  $M = 164$ .
6. Der hydroxylhaltige Rest führt bei der Perjodsäureoxydation nicht zu den für vicinale OH-Gruppen charakteristischen Oxydationsprodukten.

5. Identifizierung von Orientosid als Vitexin und Substanz C  
als Saponaretin

Die bisher erhaltenen Ergebnisse veranlassten uns, nicht nur alle bekannten Apigeninglykoside, sondern auch nicht glykosidische Apigeninderivate von bisher unbekannter Struktur mit Orientosid und Substanz C zu vergleichen. Hierbei stellten wir fest, dass Orientosid mit einem von G.A.PERKIN<sup>1)</sup> als Vitexin beschriebenen Apigeninderivat in gewissen Eigenschaften übereinstimmte.

Zu Hilfe kam uns dabei ausserdem die Tatsache, dass das Vitexin erst kürzlich von W.H.EVANS und Mitarbeitern<sup>2)</sup> strukturell aufgeklärt werden konnte und damit eine über 50 Jahre lang bestehende Diskussion über die Konstitution der Substanz, wie man hoffen darf, ihr Ende fand.

Das gelbe Pigment Vitexin wurde erstmalig von G.A.PERKIN<sup>1)</sup> aus Vitex littoralis L. isoliert. Er stellte die Summenformel  $C_{21}H_{20}O_{10}$  auf und hielt die Verbindung ebenfalls zu-

---

1) G.A.PERKIN, J.Chem.Soc.73, 1019 (1898), ibid.77, 422 (1900)  
2) W.H.EVANS, A.McGOOKIN, K.JURD, A.ROBERTSON u.W.R.N.  
WILLIAMSON, J.Chem.Soc.(London), 3510 (1957)

nächst für ein sehr stabiles Glykosid des Apigenins, bei dem der Zuckerrest an einer ungewohnten Stelle mit dem Aglykon verbunden war.

G.BARGER <sup>1)</sup> fand dann bei der Hydrolyse eines Glykosides Saponarin, welches er aus *Saponaria officinalis* L. isolierte, zwei Spaltprodukte, von denen eines mit Vitexin identisch war. Über die zweite Substanz machte er keine näheren Angaben, er nannte sie Saponaretin.

Etwas später stellte T.NAKAOKI <sup>2)</sup> fest, dass beide Substanzen, Vitexin und Saponaretin, optisch isomer sind und ineinander übergehen können.

Auf Grund vergleichender Untersuchungen und der bei der Permanganatoxydation erhaltenen 2,4,6-Trihydroxyphenyllessigsäure nahm er an, dass Vitexin ein Apigeninderivat ist, das einen 2,3,4,5,6-Pentahydroxyl-n-hexyl-Rest in Position 6 oder 8 trägt.

Von anderen Autoren wurden für Vitexin verschiedene Konstitutionsformeln, so die eines reduzierten Flavons <sup>3)</sup>, eines Chalkonderivats <sup>3)</sup> und schliesslich die eines Produkts mit reduziertem Phloroglucinkern <sup>4)</sup> diskutiert.

In jüngster Zeit haben sich, wie erwähnt, W.H.EVANS und Mitarbeiter <sup>5)</sup> erneut mit der Struktur des Vitexins beschäftigt. Übereinstimmend mit G.A.PERKIN <sup>6)</sup> fanden sie die Summenformel  $C_{21}H_{20}O_{10}$ . Bei der Oxydation des Trimethyläthers von Vitexin erhielten sie ein 8-Formyl-tri-o-methylapigenin und bewiesen damit die Verknüpfung der Seitenkette  $C_6H_7O(OH_4)$  am C<sub>8</sub> des Apigeninkerns. W.H.EVANS zog verschiedene Formeln

---

1) G.BARGER, J.Chem.Soc.(London), 89, 1210 (1906)

2) T.NAKAOKI, J.Pharm.Soc.(Japan), 64, IIa (1944), Chem. Abs. 46, 108 (1952)

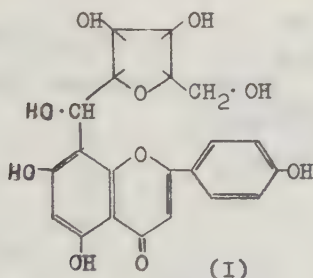
3) E.PETERI, J.Chem.Soc.(London), 1635 (1939)

4) vergl. F.MAYER, A.H.COOK, The Chemistry of Natural Coloring Matters, New York, 1943, S.201

5) W.H.EVANS, A.McGOOKIN, L.JURD, Alexander ROBERTSON u. W.R.N.WILLIAMSON, J.Chem.Soc.(London), 3510 (1957)

6) G.A.PERKIN, J.Chem.Soc.(London), 73, 1019 (1898), ibid. 77, 422 (1900)

in Betracht, von denen nach seinen Angaben folgende die grösste Wahrscheinlichkeit besitzt:



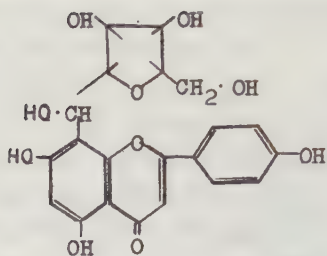
Vitexin

Auch W.H.EVANS <sup>1)</sup> bediente sich der Perjodsäuremethode, um die Struktur des Hydroxylsystems näher festzulegen, und es mag eine gewisse Bestätigung für unsere Befunde sein, wenn er schreibt:

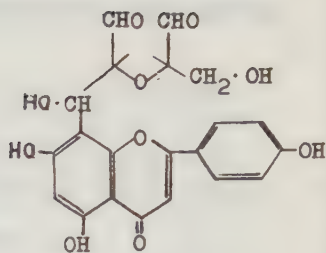
"In all cases the initial stages of the oxidation were consistent with 1:2-glycol fission but ultimately traces of formaldehyde and small amounts of volatile acid were formed with further oxidation, e.g., formation of 8-formylapigenin. The Reaction did not, however, provide evidence for the presence of a glycerol system in the vitexin side-chain. With sodium metaperiodate in place of periodic acid the results were almost equally variable and again indicated that the reaction is not confined to a smooth fission of a 1:2-glycol system. The small amounts of formaldehyde were not regarded as significant and hence the C<sub>6</sub>-residue did not appear to contain the system CH(OH).CH<sub>2</sub>.OH. It may well be that in addition to the production of 8-formylapigenin side reaction occur involving the phenolic apigenin residue."

An Stelle der erwarteten Spaltprodukte konnte jedoch W.H.EVANS durch Perjodsäure bzw. Natriumperjodatlösung das Vitexin (I) unter Ringöffnung zu Dehydrosecovitexin (II) oxydieren.

1) W.H.EVANS, A.McGOOKIN, L.JURD, ALEXANDER ROBERTSON u.  
W.R.N.WILLIAMSON, J.Chem.Soc. (London), 3510 (1957)

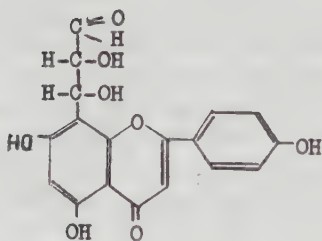


(I)

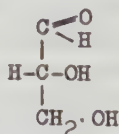


(II)

Aus (II) entsteht durch warme methanolische Schwefelsäure einerseits D-Glycerinaldehyd (IV) in Form seines Dimethylazetals, andererseits ein Spaltprodukt, das am C<sub>8</sub> des Grundgerüsts einen Glycerinaldehyd trägt (III). Von dieser Verbindung (III) existieren 2 optisch Isomere, die durch fraktionierte Kristallisation getrennt und bestimmt wurden.



(III)



(IV)

Umgekehrt kann das Dehydrosecovitexin (II) aus (III) und authentischem Glycerinaldehyd (IV) zurückgebildet werden. An Hand der hier vereinfacht angegebenen Abbaureaktionen konnte W.H.EVANS die oben angegebene Formel des Vitexins (I) beweisen.

Betrachten wir nun die für das Vitexin ermittelten Daten mit den von uns für Orientosid gefundenen Werten, so ergeben sich folgende Gegenüberstellungen:

T a b e l l e 11

|                                                                   | <u>Orientosid</u>                             | <u>Vitexin</u>                                                         |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <u>Schmelzpunkt</u>                                               | 259°C                                         | 260°C 1)<br>257-58°C 2)<br>259°C 3)<br>264°C 4)                        |
| <u>UV-Absorptionsspektrum</u>                                     | Max <sub>I</sub> 333<br>Max <sub>II</sub> 271 | 334 3) 332 4)<br>270 270                                               |
| <u>CH-Bestimmung und</u><br><u>Molekulargewicht gef.</u>          | Orientosid 2)<br>Vitexin 3)<br>Vitexin 4)     | C H<br>57,80 4,5<br>57,74 4,95<br>57,92 5,2<br>57,80 4,77<br>58,40 4,6 |
| <u>ber. für C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub></u>        |                                               | 58,3 4,6                                                               |
| <u>Azetylderivat von Orientosid bzw. Vitexin</u>                  |                                               |                                                                        |
|                                                                   | C                                             | H CH <sub>3</sub> CO                                                   |
| Orientosidazetat                                                  | 57,40 %                                       | 4,86 % 42,33 %                                                         |
| Vitexinazetat 4)                                                  | 57,90 %                                       | 4,90 % 42,7 %<br>41,3 %                                                |
| <u>ber. für Heptaazetat</u>                                       |                                               |                                                                        |
| C <sub>21</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> (OAc) <sub>7</sub> | 57,9 %                                        | 4,7 % 41,5 %                                                           |

Die für Orientosid gefundenen Werte waren mit der von W.H.EVANS 4) für Vitexin angegebenen Formel und den von ver-

- 1) G.BARGER, J.Chem.Soc.(London), 89, 1210 (1906)
- 2) T.NAKAOKI, J.Pharm.Soc.(Japan), 64, IIa (1944), Chem. Abs.46, 108 (1952)
- 3) M.K.SEIKEL u.T.A.GEISSMAN, Arch.Biochem.Biophys.71, 17-30 (1957)
- 4) W.H.EVANS, A.McGOOKIN, L.JURD, ALEXANDER ROBERTSON u. W.R.N.WILLIAMSON, J.Chem.Soc.(London), 3510 (1957)

schiedenen anderen Autoren gefundenen Werten gut vereinbar. Nach Abschluss der Arbeiten erhielten wir authentisches Vitexin von Prof.W.B.WHALLEY, University of Liverpool.

Sowohl aus unserem und den von Prof.W.B.WHALLEY mit Orientosid angestellten Untersuchungen ergibt sich die Identität beider Substanzen.

Wir danken Herrn Prof.W.B.WHALLEY für die Übersendung von Vitexin und die vorgenommenen Vergleichsuntersuchungen.

Für das Heptaazetat des Orientosids errechnet sich ein Molekulargewicht von 726. Die Molekulargewichtsbestimmung ergab dagegen  $M = 624$ . Diese Differenz kann eventuell darauf zurückzuführen sein, dass die Molekulargewichtsbestimmung des Azetats in geschmolzenem Kampfer durchgeführt wurde.

Die folgenden Untersuchungen sollen die in Tabelle 11 erkennbaren Übereinstimmungen von Orientosid mit Vitexin noch weiter verdeutlichen.

#### a) Beziehungen zwischen Vitexin und Saponaretin

T.NAKAOKI <sup>1)</sup> beobachtete bei der Hydrolyse des Saponarins dass neben dem Vitexin ein weiteres "Aglykon", das Saponaretin entstanden war. Das Saponaretin bildete die erste Hydrolysenstufe. Da es durch stärkere Säurekonzentration und stärkeres Erhitzen in Vitexin umgewandelt werden konnte, nahm T.NAKAOKI an, dass die beiden Substanzen miteinander isomer sind.

Umgekehrt gelang es später L.JURD, T.A.GEISSMAN und M.K.SIEKEL <sup>2)</sup> das Vitexin durch starke Säurebehandlung in das Saponaretin überzuführen. Beide Erscheinungen waren dem Verhalten von Orientosid bzw. Substanz C analog. Um die Identität des Orientosids mit Vitexin einerseits und der Substanz C mit Saponaretin auf der anderen Seite zu sicher

---

1) T.NAKAOKI, J.Pharm.Soc.(Japan), 64, IIa (1944)

2) L.JURD, T.A.GEISSMAN u.M.K.SIEKEL, Arch.Biochem.Biophys. 67, 284 (1957)

stellten wir für vergleichende Untersuchungen aus Saponarin dessen Verseifungsprodukte Vitexin und Saponaretin dar.

b) Isolierung von Saponarin und dessen Spaltprodukten Vitexin und Saponaretin

Das Saponarin selbst isolierten wir nach einer Vorschrift von G.BARGER <sup>1)</sup> aus *Saponaria officinalis* L. <sup>+</sup>). Die gelblich-weissen Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 235°C (Lit.Smp.233°C). Nach Hydrolyse des Glykosids mit 5%iger Salzsäure durch fünfstündiges Kochen auf freier Flamme konnten wir papierchromatographisch wie erwartet Vitexin ( $R_f$ -Wert 0,37) und Saponaretin ( $R_f$ -Wert 0,51) <sup>++</sup>) sowie Glukose feststellen.

Durch präparative Papierchromatographie gelangten wir zwar nicht zu kristallinen Produkten, jedoch zu reinen alkoholischen Lösungen, die ebenfalls zur vergleichenden Papierchromatographie mit Orientosid und Substanz C verwendet werden konnten (s.Tab.12)

T a b e l l e 12

| Lösungsmittelsysteme                     | Vitexin    | Orientosid | Saponaretin | Substanz C |
|------------------------------------------|------------|------------|-------------|------------|
| Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)          | $R_f$ 0,35 | 0,35       | 0,50        | 0,49       |
| Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) | $R_f$ 0,37 | 0,38       | 0,52        | 0,51       |
| Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)  | $R_f$ 0,54 | 0,55       | 0,75        | 0,75       |

1) G.BARGER, Ber.dtsch.Chem.Ges. 35, 1296 (1902)

<sup>+</sup>) Die Isolierung erfolgte durch H.NIESCHLAG.

<sup>++</sup>) Lösungsmittel: Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3)

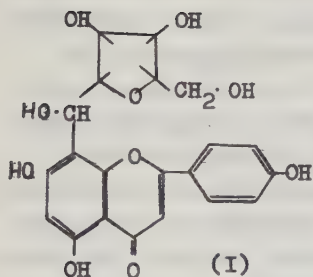
Das Vitexin entspricht papierchromatographisch dem Orientosid und das Saponaretin der Substanz C.

In jüngster Zeit wurden Saponarin bzw. Vitexin und Saponaretin mehrfach isoliert und beschrieben.

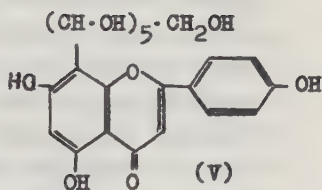
T.A.GEISSMAN und U.KRANEN-FIEDLER <sup>1)</sup> isolierten Vitexin und ein Vitexin-4'-rhamnosid aus *Crataegus oxyacantha* L. Ferner berichteten L.JURD, T.A.GEISSMAN und M.K.SEIKEL <sup>2)</sup> über das Vorkommen von Saponarin, Saponaretin und Vitexin in *Spirodella oligorrhiza*, L. M.K.SEIKEL und T.A.GEISSMAN <sup>3)</sup> isolierten Saponarin, Vitexin und Saponaretin aus *Hordeum vulgare* L. Die letztgenannten Autoren glaubten, dass der Unterschied zwischen Vitexin und Saponaretin nicht allein durch die Stereoisomerie der beiden Moleküle bedingt sein kann, wie T.NAKAOKI <sup>4)</sup> annahm, sondern, dass einmal eine geschlossene Seitenkette im Fall des Vitexin (I) und im anderen Falle beim Saponaretin (V) die Hydratform als "offene" Seitenkette vorliegt, wie es das folgende Reaktionsschema wiedergibt. Dieser Hypothese würde auch der hohe  $R_f$ -Wert des Saponaretins in wässriger Lösung gerecht. Eine nicht minder plausible Erklärung wäre damit aber weiter für die Schwierigkeiten bei der Kristallisation gefunden. Saponaretin besitzt nach M.K.SEIKEL und T.A.GEISSMAN <sup>3)</sup> eine nicht kristalline, gelatinlöse Konsistenz. Auch uns war es nicht gelungen, nach der präparativen Papierchromatographie die Substanz kristallin zu erhalten.

Da nun auch das gleichzeitig von uns isolierte Orientin in vielen Eigenschaften mit Orientosid übereinstimmte,

- 
- 1) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturwiss. 43, 226 (1956)
  - 2) L.JURD, T.A.GEISSMAN u. M.K.SEIKEL, Arch.Biochem.Biophys. 62, 284-297 (1957)
  - 3) M.K.SEIKEL u. T.A.GEISSMAN, Arch.Biochem.Biophys. 71, 17-30 (1957)
  - 4) T.NAKAOKI, J.Pharm.Soc.(Japan), 64, IIa (1944)



Vitexin



Saponaretin

sei hier schon, bevor die UV- und IR-spektroskopischen Untersuchungen behandelt werden, auf das Orientin näher eingegangen.

#### 6. Weitere Untersuchungen über Orientin

F.GLOGGENGIESSER <sup>1)</sup> hatte Orientin als ein Luteolin-7-Glykosid charakterisiert, obwohl er keinen Zucker als Spaltprodukt erhalten hatte. Er nahm an, dass er auch hier nur wegen der geringen Spaltbarkeit und der energischen Hydrolysenmethoden zu keinem papierchromatographisch nachweisbaren Zucker gelangen konnte.

Wir versuchten daher auch hier zunächst die KILIANI-Methode.

##### a) KILIANI-Hydrolyse von Orientin

Die Hydrolyse wurde ebenso wie beim Orientosid und bei Substanz C durch vierstündiges Kochen mit der KILIANI-MIXTUR ausgeführt.

Die Äthylazetatausschüttelung wurde zur vergleichenden Papierchromatographie der Flavone benutzt, die flavonfreie, saure Hydrolysenflüssigkeit über Dowex 2 neutrali-

---

1) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)

siert und zur papierchromatographischen Identifizierung der Zucker auf etwa 3 ml konzentriert. Neben unverändertem Orientin fanden wir papierchromatographisch das Aglykon Luteolin und ein ebenso fluoreszierendes intermediäres Spaltprodukt mit dem  $R_f$ -Wert 0,39. Diese intermediär aufgetretene Substanz, die wir Homo-Orientin nennen wollen, konnte das Analogon zu der aus Orientosid (Vitexin) erhaltenen Substanz C (Saponaretin) sein. Bei Orientin haben wir ein Luteolingerüst und bei Orientosid (Vitexin) ein Apigeningerüst vorliegen.

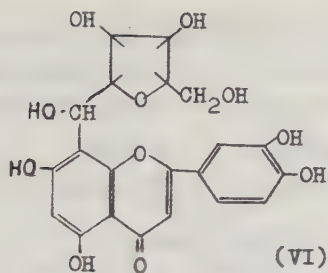
T a b e l l e 13

| Lösungsmittelsysteme                     | Orientin   | Luteolin | Homo-Orientin |
|------------------------------------------|------------|----------|---------------|
| Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)          | $R_f$ 0,29 | 0,79     | 0,39          |
| Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) | $R_f$ 0,31 | 0,80     | 0,36          |
| Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)  | $R_f$ 0,51 | 0,28     | 0,61          |

#### b) Untersuchung auf Zucker

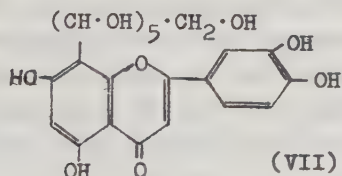
Der "Zuckernachweis" erfolgte wie beim Orientosid angegeben. Auch hier fanden wir eine Parallele. Kein mit den üblichen Zuckern (Glukose, Galaktose, Rhamnose, Arabinose, Laktose, Xylose, Ribose, Mammose) übereinstimmender Chromatogrammleck konnte gefunden werden. Erst beim Erhitzen des Chromatogramms auf 210°C im Trockenschrank trat derselbe beim Orientosid beschriebene rotbraune Fleck auf. ( $R_f$ -Wert = 0,65 in Pyridin-Äthylazetat-Wasser 1+2+2.) Es ist daher anzunehmen, dass es sich hierbei um das gleiche Spaltprodukt handelt, das auch beim Orientosid gefunden wurde.

Auf Grund dieser Ergebnisse glauben wir, dass Orientin das Luteolinanalogon des Vitexins (Orientosid) darstellt und folgende Formel besitzt:



Orientin

Das durch Säurebehandlung aus Orientin erhaltene Produkt dürfte damit dem Saponaretin entsprechen. Wir wollen es Homo-Orientin nennen und schreiben dafür Formel (VII)



Homo-Orientin

### c) Analysenwerte

Dass auch die Verhältnisformeln von Orientin und seinem Azetat gut auf die nach der neuen Formel berechneten Werte stimmen, geht aus der folgenden Übersicht (s.Tab.14, S.46) hervor.

Das Azetylprodukt wurde nach der üblichen Methode mit Natriumazetat (wasserfr.) und Essigsäure-Anhydrid hergestellt. Nach der Formel (VI) war ein Oktaazetat zu erwarten, was sich auch bestätigte. Für dieses Oktaazetat sind auch die gefundenen Werte für das Molekulargewicht gut vereinbar.

T a b e l l e 14

|                                     |                           |                    |         |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------|---------|
| <u>Orientin</u>                     | $C_{21}H_{21}O_{11}$      | ber. Mol.-Gew. 449 |         |
| gef.:                               | C 56,10                   | H 4,48             | O 39,40 |
| ber.:                               | C 56,12                   | H 4,66             | O 39,22 |
| <u>Orientinazetat</u>               | $C_{21}H_{13}O_3 (OAc)_8$ |                    |         |
| gef.:                               | C 56,85                   | H 4,77             | O 38,38 |
| ber.:                               | C 56,12                   | H 4,80             | O 39,07 |
| <u>Molekulargewicht des Azetats</u> |                           |                    |         |
| gef.:                               | M = 789                   |                    |         |
| ber.:                               | M = 791 für $(OAc)_8$     |                    |         |

Während wir noch an Hand dieser Ergebnisse die Struktur des Orientins diskutierten, erhielten wir für die Richtigkeit unserer Annahmen noch eine zusätzliche Bestätigung. Fast gleichzeitig war es nämlich einigen von uns, unabhängig voneinander und aus zwei verschiedenen Pflanzen, gelungen ein zweites Orientin bzw. Derivate des Orientins zu isolieren.

S.H.DHINGRA <sup>1)</sup> isolierte eine Substanz aus *Spartium junceum* L., die im Schmelzpunkt, UV- und IR-Spektrum sowie in den CH-Werten dem Orientin vollständig entsprach.

Aus *Adonis vernalis* L. isolierte W.LEEB <sup>2)</sup> das von ihm so benannte Adonivernithin. Bei der Hydrolyse erhielt er Orientin ( $R_f$ -Wert 0,29), Adonivernith ( $R_f$ -Wert 0,39) <sup>+</sup>

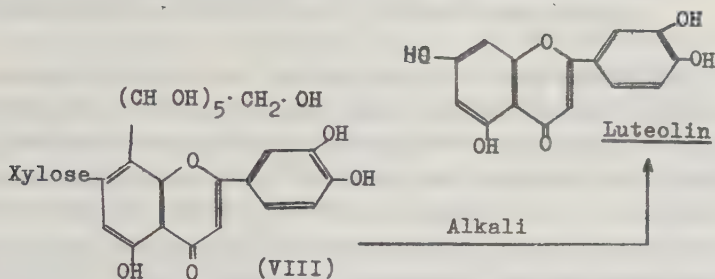
1) H.S.DHINGRA, Dissertation, Universität München (1958)

2) W.LEEB, Dissertation, Universität München (1958)

<sup>+</sup>) Lösungsmittel: Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)

Die Elementaranalysen und Molekulargewichtsbestimmungen des Orientosids und Orientins wurden von A.BERNHARDT, Mikroanalytisches Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr, ausgeführt.

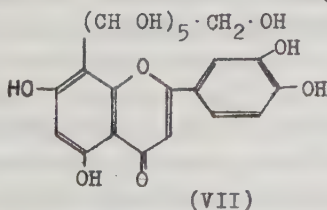
und Xylose. Im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen nahm er die Strukturformel (VIII) an:



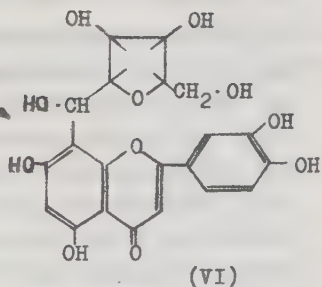
Adonivernithin

Hydrolyse  
mit HCl

Xylose



Adonivernith  
(Homo-Orientin)



Orientin

Die Hydrolyseprodukte des Adonivernithins (VII) und (VI) wurden mit unserem Orientin bzw. Homo-Orientin in verschiedenen Lösungsmitteln verglichen. Wir fanden Übereinstimmung in der Laufhöhe und in der Fluoreszenz.

7. Stellungnahme zu den IR-spektroskopischen Arbeiten von F.GLOGGENGIESSER und neue IR-spektroskopische Untersuchungen zur Struktur von Orientosid und Orientin

F.GLOGGENGIESSER <sup>1)</sup> hatte an Hand von über 60 Flavon-IR-Vergleichsspektren die damaligen IR-Spektren von Orientosid und Orientin in der Weise diskutiert, dass er einmal aus der Lage der C=O-Bande bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  ein Flavon mit freiem C<sub>5</sub>-Hydroxyl, und zum anderen aus den Banden im Bereich von 830 bis  $770\text{ cm}^{-1}$  eine Disubstitution für Orientin und eine Monosubstitution für Orientosid ableitete. Diese Befunde standen in Übereinstimmung mit dem Alkaliabbau und den Ergebnissen der KILIANI-Hydrolyse.

Die starken Banden zwischen  $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  ordnete er den OH-Deformationsschwingungen der Zucker zu, die auch bei den anderen untersuchten Flavonglykosiden an dieser Stelle gefunden wurden. Er leitete hieraus die Glykosid-Natur beider Substanzen ab nachdem auch der R<sub>F</sub>-Wert und die Azetylierung gute Hinweise in dieser Richtung gebracht hatten.

Nachdem uns nunmehr auch das Vitexin (s.Abb.7, S.50) zu einem Vergleich zur Verfügung stand, liessen wir von Orientosid und Orientin nochmals IR-Spektren aufnehmen (s.Abb.8, 9, s. S.50) und konzentrierten die Untersuchungen vor allem auf den Bandenbereich zwischen  $1100\text{ und }1000\text{ cm}^{-1}$ . Inwieweit die nicht sehr scharfen Konturen der von F.GLOGGENGIESSER aufgenommenen IR-Spektren auf die schlechte Ausmessung oder auf Verunreinigungen der Substanzen zurückgeführt werden müssen ist nicht mehr sicher zu entscheiden, jedenfalls ergah sich bei unserem Versuch, dass das Vitexin, Orientosid und Orientin (s.Abb.7, 8, 9) in diesen Bereich gute Übereinstimmungen aufwiesen. Damit ist einmal mit grosser Wahrscheinlichkeit gezeigt, dass alle drei Stoffe denselben hydroxylhaltigen Rest enthalten, zum anderen auch wird, legt man die EVANSsche Formel zu Grunde, erklärt, warum die OH-Deformations- bzw.

---

1) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)

die C-O-Valenzschwingungen <sup>†</sup>) des "Zuckerrestes" verglichen mit denselben der normalen Hexoside oder Pentoside weniger intensiv erscheinen.

Die Banden normaler Flavonglykoside in diesem Absorptionsbereich erreichen nämlich im allgemeinen die Intensität der C=O-Bande. Als Erklärung für diesen Unterschied kann man nunmehr ohne weiteres die völlig andere Hydroxylanordnung und die neuartige Ringschlussbildung gegebenenfalls auch die C-C-Bindung des Restes am Genin angeben.

Eine gewisse Bestätigung für die Interpretation dürfte das IR-Spektrum des Saponaretins bieten (s. Abb. 10, S. 51), in dem ja der hydroxylhaltige Rest wieder als Kette vorliegen soll. Tatsächlich scheint es so als besitze das Saponaretin mit dem Saponarin, zieht man wieder den Bereich von  $1100-1000\text{cm}^{-1}$  zum Vergleich heran, mehr Ähnlichkeit als mit dem Vitexin. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang, dass sich die Anwesenheit eines Monosids oder Biosids in einer veränderten Intensität der C=O-Valenz bzw. OH-Deformationsschwingungen nur wenig zu erkennen gibt.

Die neuen IR-spektroskopischen Untersuchungen ergänzen die analytischen Befunde und geben uns zusätzlich einen sicheren Beweis, dass Orientosid mit Vitexin identisch ist.

---

<sup>†</sup>) von F.GLOGGENGIESSER unerwähnt geblieben.

Bei den Aufnahmen ist zu berücksichtigen, dass die Messungen an verschiedenen Geräten durchgeführt wurden.

Abb. 7  
Infrarotspektrum  
von Vitexin in KBr.  
(konz. 280 g/300mg)

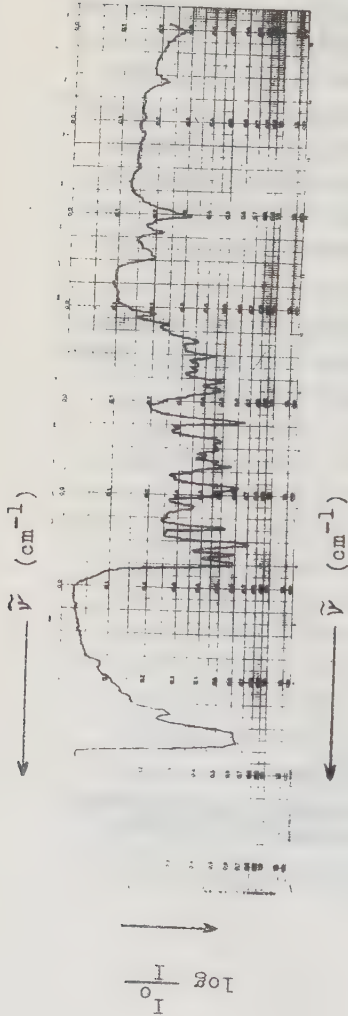


Abb. 8  
Infrarotspektrum  
von Orientosid in KBr.  
(konz. 500 g/300mg)

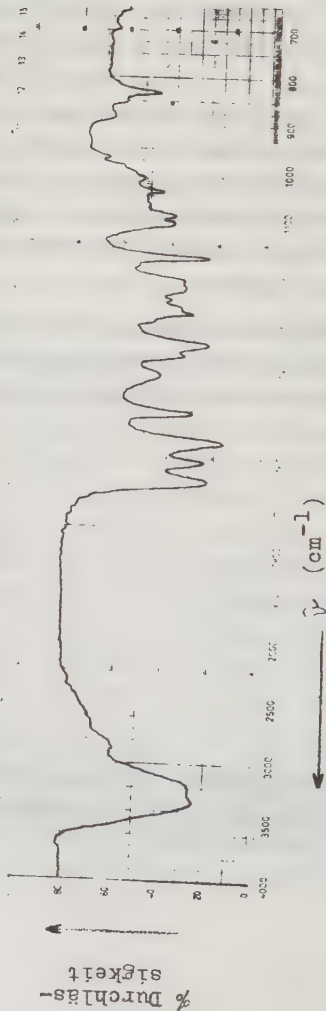


Abb. 9  
Infrarotspektrum  
von Orientin in KBr.  
(konz. 1000 g/300mg)

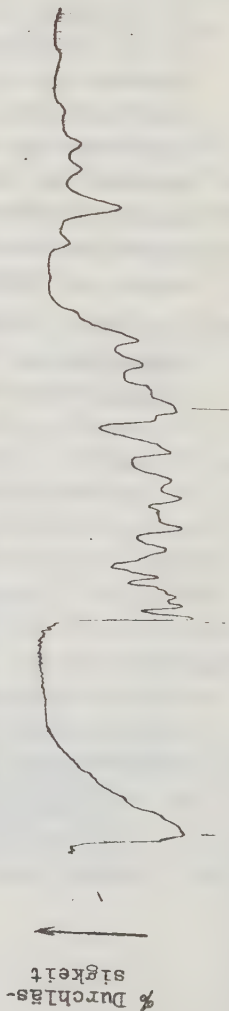


Abb. 10

Infrarotspektrum  
von Saponaretin  
in KBr.  
(konz. 180 g/100 mg)

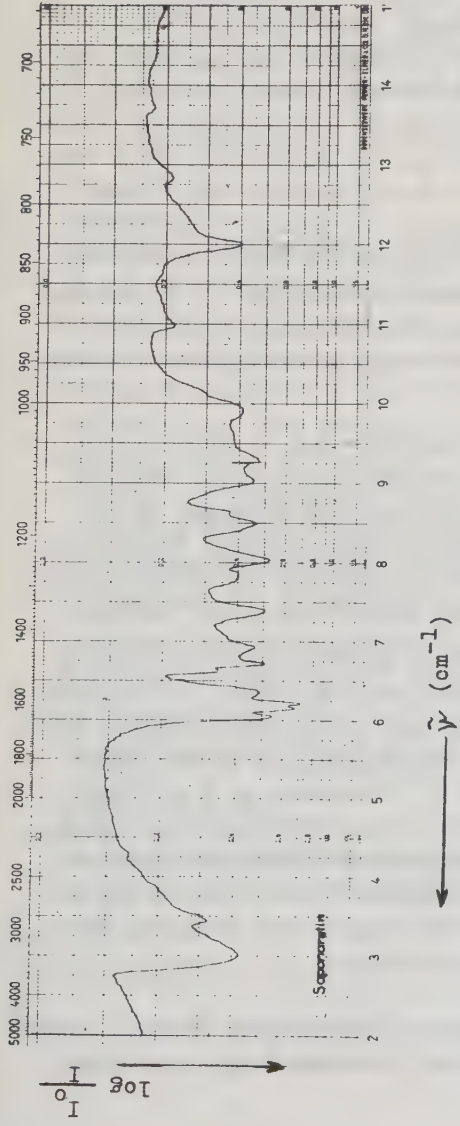
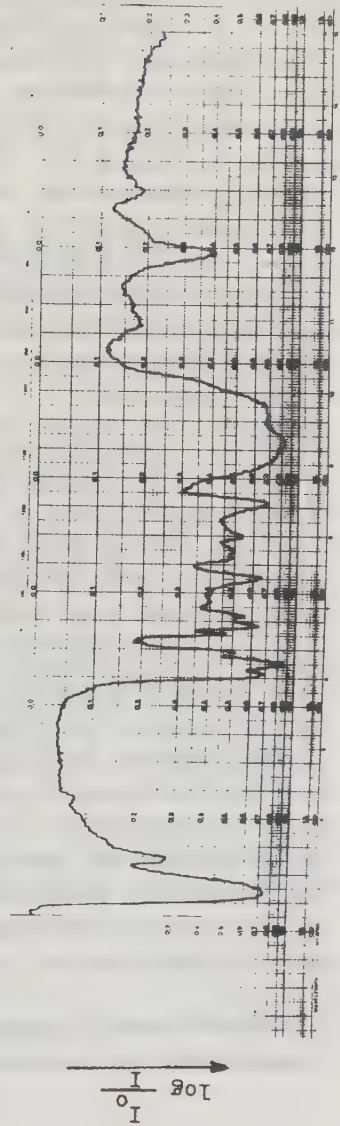


Abb. 11

Infrarotspektrum  
von Saponarin  
in KBr.  
(konz. 1200 g/300 mg)



8. Über das UV-spektrophotometrische Verhalten von Orientosid und Orientin, diskutiert an Hand der von W.H.EVANS für Vitexin vorgeschlagenen Strukturformel

a) Normalspektren

F.GLOGGENGIESSER <sup>1)</sup> hielt, wie im vorangegangenen Abschnitt (IR-Spektren) dargelegt, die Glykosidnatur des Orientosids und Orientins für wahrscheinlich, obwohl er keine Zucker einwandfrei nachweisen konnte. Auf Grund dieser Annahme standen für ihn als Ort der Zuckersubstitution nur die Stellungen  $C_7$  oder  $C_4$ , zur Diskussion. Eine Entscheidung hierüber ist aber im allgemeinen auf UV-spektrophotometrischem Wege möglich. So konnte B.SKARZYNSKI <sup>2)</sup> zeigen, dass  $C_7$  Glykoside die gleichen Maxima aufweisen wie die dazugehörigen Aglykone, während bei  $C_4$  Glykosiden eine bathochrome Verschiebung des Maximums I und eine hypsochrome Verschiebung des Maximums II gegenüber ihrem Aglykon auftritt.

Wendet man diese Gesetzmässigkeiten auf Orientosid und Orientin an, so scheint es tatsächlich so, als besitze Orientin einen Zucker am  $C_7$ , Orientosid hingegen in  $C_4$ , Stellung. Nachdem auch, wie wir anschliessend sehen werden, die typische Verschiebung in Borsäure-Natriumazetat auftrat, stand einer solchen Definition nichts im Wege.

Wie wir jetzt wissen, wurde im Rahmen dieser Diskussion nicht genügend beachtet, dass auch bei einer C-C-Verknüpfung an einer der Hydroxylgruppe benachbarten Stelle das gleiche Spektrum erhalten werden kann. In diesem Falle sind die Positionen  $C_7$  und  $C_8$  gleichrangig, d.h. weder eine Substitution am  $C_7$  noch am  $C_8$  beeinflusst die Lage der UV-Banden. Bei einer Gegenüberstellung der Spektren von Orientosid, Orientin, Substanz C und Vitexin mit denen von Luteolin und Apigenin ergibt sich folgende Übersicht (s.Tab.15):

---

1) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)

2) L.MARCHLEWSKI u. B.SKARZYNSKI, Biochem.Z. 297, 56 (1938)

T a b e l l e 15

| Flavon     | Max <sub>I</sub> | Max <sub>II</sub> |
|------------|------------------|-------------------|
| Apigenin   | 3360 Å           | 2690 Å            |
| Vitexin    | 3340 (-20)       | 2700 (+10)        |
| Orientosid | 3330 (-30)       | 2710 (+20)        |
| Substanz C | 3360 (0)         | 2710 (+20)        |
| Luteolin   | 3500 Å           | 2560 Å            |
| Orientin   | 3510 (+10)       | 2570 (+10)        |

b) Spektrum in alkoholischer Natriumazetatlösung

Da die in Flavonen vorhandenen phenolischen Gruppen je nach Stellung im Molekül über ganz unterschiedliche Dissoziationskonstanten verfügen, äussert sich eine Substitution an einer dieser OH-Gruppen beim Alkalisieren in einer mehr oder minder starken Verschiebung der Banden nach langen Wellen. Wie T.A.GEISSMAN und U.KRANEN-FIEDLER<sup>1)</sup> beobachteten, erleiden Glykoside mit einem anderen Zuckersubstituenten als am C<sub>7</sub> eine starke Verschiebung, während bei C<sub>7</sub>-Substitution der bathochrome Effekt kaum ins Gewicht fällt.

Wir haben die in der Literatur angegebenen Werte für Vitexin, Saponaretin, Vitexin-4'-rhamnosid und Apigenin-7-rhamnoglukosid mit den von uns gemessenen Werten des Orientosids, Orientins, der Substanz C, des Apigenins und Luteolins verglichen und sind dabei zu folgendem Ergebnis gekommen:

Die Bandenverschiebung von Orientosid stimmt grössenordnungsmässig mit der des Vitexins und der Substanz C über-

---

1) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturw. 43, 226 (1956)

T a b e l l e 16

| Flavon                                      | Max <sub>I</sub> | Max <sub>II</sub> | Max <sub>I</sub> | Max <sub>II</sub> | Max <sub>I</sub> | Max <sub>II</sub> |
|---------------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Saponaretin <sup>1)</sup>                   | 3360 Å           | 2720 Å            | 3780 Å           | 2800 Å            | + 420 Å          | + 80 Å            |
| Substanz C                                  | 3360             | 2710              | 3720             | 2760              | + 360            | + 50              |
| Vitexin <sup>1)</sup>                       | 3340             | 2700              | 3700             | 2780              | + 360            | + 80              |
| Orientosid                                  | 3330             | 2710              | 3750             | 2800              | + 410            | + 90              |
| Apigenin                                    | 3360             | 2690              | 3790             | 2770              | + 430            | + 80              |
| Vitexin-4'-<br>rhamnosid <sup>1)</sup>      | 3350             | 2720              | 3800             | 2800              | + 450            | + 80              |
| Apigenin-7-<br>rhamnoglukosid <sup>1)</sup> | 3350             | 2700              | 3400             | 2680              | + 50             | + 20              |
| Luteolin                                    | 3500             | 2570              | 3820             | 2640              | + 320            | + 70              |
| Orientin                                    | 3510             | 2570              | 3810             | 2740              | + 300            | + 170             |
| Luteolin-7-<br>glukosid                     | 3520             | 2560              | 3670             | 2700              | + 150            | + 140             |

ein. Für die geringe Differenz (50 Å) können unterschiedliche Messbedingungen der Anlass sein, es ist aber auch denkbar, dass der hydroxylhaltige Rest in der Ringform durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen Einfluss auf die Dissoziierbarkeit des C<sub>7</sub>-OH ausübt, da beispielsweise das Saponaretin und auch das Apigenin selbst im Mittel stärker langwellig absorbieren. Warum dann allerdings ein von T.A.GEISSMAN und U.KRANEN-FIEDLER <sup>2)</sup> isoliertes Vitexin-4'-rhamnosid eine stärkere bathochrome Verschiebung erfahren soll, als das Vitexin, muss vorerst noch ohne eine Konzeption bleiben.

Obwohl F.GLOGGENGIESSER <sup>3)</sup> diese Messungen nicht durchgeführt hat und ihm kein Apigenin-7-rhamnoglukosid zum Vergleich zur

1) L.JURD, T.A.GEISSMAN u.M.K.SEIKEL, Arch.Biochem.Biophys. 67, 285 (1957)

2) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturw. 43, 226 (1956)

3) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)

Verfügung stand, wäre die Annahme, dass Orientosid ein 4'-Glykosid ist auch heute noch vertretbar, wenn nicht die neuesten Arbeiten andere Gesichtspunkte gebracht hätten. Hingegen muss die Erklärung von F.GLOGGENGIESSER für die C<sub>7</sub>-Substitution am Orientin auf Grund der Natriumazetatverschiebung korrigiert werden. Für die Verschiebung des Max<sub>II</sub> herrscht zwar zwischen dem Luteolin-7-glukosid und dem Orientin grössenmässige Übereinstimmung, nicht jedoch für das Max<sub>I</sub>, bei dem eine Differenz von 150 Å beobachtet wird. Da wir bei der Nachprüfung dieser Messungen zu demselben Ergebnis gelangten; andererseits für das Max<sub>I</sub> bei Luteolin ebenfalls eine Natriumazetatverschiebung von ca. 300 Å erhielten, haben wir den analogen Fall zum Orientosid - Apigenin. Das Vitexin (Orientosid) und das Orientin folgen also ohne weiteres den von T.A.GEISSMAN und U.KRANEN-FIEDLER <sup>1)</sup> aufgestellten Regeln.

c) Spektrum in alkoholischer Borsäure-Natriumazetatlösung

Untersuchungen von L.JURD <sup>2)</sup> über das Komplexbildungsvermögen von Borsäure bei Flavonen haben gezeigt, dass nur beim Vorhandensein von zwei benachbarten Hydroxylgruppen (ortho-Dioxygruppierung) eine Komplexbildung mit Borsäure in Natriumazetatmilieu möglich ist. Diese äussert sich in einer starken bathochromen Verschiebung der Maxima. Die Verschiebung unterbleibt, wenn eine Monooxygruppierung vorliegt oder ein Hydroxyl einer ortho-Dioxygruppe verglykosidiert oder verestert ist. Wir haben auch hier eine Zusammenstellung gegeben (s.Tab.17, S.56).

Aus dieser geht hervor, dass dem Apigenin, Orientosid, Substanz C und Spiraeosid eine Monosubstitution, dem Luteolin-7-glukosid und Orientin hingegen eine freie Dioxygruppe im Seitenphenyl zukommt.

---

1) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturw. 43, 226 (1956)

2) L.JURD, Arch.Biochem.Biophys. 63, 376 (1956)

T a b e l l e 17

| F l a v o n                        | absolutes Äthanol |                   | Äthanol u. Bors. u. Natr. Azetat |                   | Verschiebung der Maxima |                   |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
|                                    | Max <sub>I</sub>  | Max <sub>II</sub> | Max <sub>I</sub>                 | Max <sub>II</sub> | Max <sub>I</sub>        | Max <sub>II</sub> |
| Apigenin                           | 3360 Å            | 3690 Å            | 3370 Å                           | 3680 Å            | + 10 Å                  | - 10 Å            |
| Orientosid                         | 3330              | 2710              | 3340                             | 2710              | - 10                    | + 0               |
| Substanz C                         | 3360              | 2710              | 3350                             | 2690              | - 10                    | - 20              |
| Querzetin-4'-glukosid (Spiraeosid) | 3660              | 2540              | 3680                             | 2530              | + 20                    | - 10              |
| Luteolin-7-glukosid                | 3500              | 2560              | 3750                             | 2610              | +250                    | + 50              |
| Orientin                           | 3510              | 2570              | 3770                             | 2630              | +260                    | + 60              |

Dieser Befund bestätigte an sich nur die schon durch den Alkaliabbau erwiesene Mono- bzw. Dioxygruppierung im Seitenphenyl. Für F.GLOGGENGIESSER <sup>1)</sup> war die starke Verschiebung des Orientins wiederum ein Beweis für seine C<sub>7</sub>-Verglykosidierung. Die Substitution am C<sub>8</sub> wird von diesen Messungen nicht betroffen.

d) Spektrum auf Zusatz von Aluminiumchlorid

Nachdem auch häufig das Komplexbildungsvermögen der Flavone zur Klärung der Substitutionsverhältnisse herangezogen wird, sei am Schluss noch auf die AlCl<sub>3</sub>-Verschiebung eingegangen.

Die Veränderung der Hauptbande eines Spektrums in Gegenwart von Aluminiumchlorid untersuchten J.B.HARBORNE (2) und T.SWAIN (3). Abhängig von der Anzahl der zur Komplexbildung befähigten Gruppen trat auf Zusatz von Aluminiumchlorid eine mehr oder weniger intensive Verschiebung der

1) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation, Universität München (1957)

2) J.B.HARBORNE, Chem. & Ind. 1142 (1954)

3) T.SWAIN, ibid. 1480 (1954)

Maxima in den langwelligen Bereich auf. L.JURD und T.A.GEISSMAN (1) fanden nur bei den Flavonen, bei denen eine o-Dioxygruppierung bzw. eine o-Hydroxycarbonylgruppe - allein oder in Konjugation zueinander - vorliegt, auf Zusatz von Aluminiumchlorid eine starke Verschiebung der Normalspektren.

T a b e l l e 18

| F l a v o n | absolutes Äthanol |                   | Aluminiumchlorid |                   | Verschiebung der Maxima |                   |
|-------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
|             | Max <sub>I</sub>  | Max <sub>II</sub> | Max <sub>I</sub> | Max <sub>II</sub> | Max <sub>I</sub>        | Max <sub>II</sub> |
| Substanz C  | 3360 Å            | 2710 Å            | 3420 Å           | 2770 Å            | + 60 Å                  | + 60 Å            |
| Saponaretin | 3360              | 2720              | 3420             | 2800              | + 60                    | + 80              |
| Orientosid  | 3330              | 2710              | 3410             | 2780              | + 80                    | + 70              |
| Vitexin     | 3340              | 2700              | 3400             | 2780              | + 60                    | + 80              |
| Apigenin    | 3360              | 2690              | 3440             | 2740              | + 80                    | + 50              |
| Luteolin    | 3500              | 2570              | 3700             | 2720              | +200                    | +150              |
| Orientin    | 3510              | 2570              | 3700             | 2720              | +190                    | +150              |

Bei Apigenin (4'5,7-Trioxyflavon) war die Verschiebung erwartungsgemäss gering, während bei Luteolin (3'4'5,7-Tetraoxyflavon) beide Maxima stark in den langwelligen Bereich verschoben waren. Vitexin, Orientosid, Saponaretin und Substanz C hatten wie Apigenin nur eine durchschnittliche Bandenverschiebung von 60 Å. Sie gehören demnach zur Gruppe derjenigen Flavone, die keine freie o-Dioxygruppe enthalten.

Diese Befunde bestätigen die bisherigen Ergebnisse und zeigen erneut, dass Orientosid und Vitexin miteinander identisch sind. Aus den spektrophotometrischen Messungen geht ausserdem hervor, dass Orientin das Struktur analogon zum Vitexin darstellt.

1) L.JURD u. T.A.GEISSMAN, J.Org.Chemistry, 21, 1395 (1956)

## C. Experimenteller Teil

### Herkunft der Pflanzen

Die zur Isolierung verarbeiteten Blüten und Blätter von *Polygonum orientale* L. stammen aus dem Botanischen Garten in München. Die Blüten wurden im Monat Juli gesammelt und sofort an der Luft getrocknet, die Blätter erhielten wir im September .

### I. Isolierung der Blütenflavone von *Polygonum orientale* L.

#### 1. Bereitung des Rohextraktes

500 g getrocknete und fein zerkleinerte Blüten von *Polygonum orientale* L. zogen wir im Soxhlet-Apparat erschöpfend mit Petroläther und anschliessend mit Chloroform aus, um auf diese Weise harzartige Substanzen und den grössten Teil des Chlorophylls zu entfernen. Nun extrahierten wir die Droge mit Methanol bis zur Farblosigkeit des Extraktionsmittels.

Den braunen Methanolextrakt engten wir im Vakuum auf 30 ml ein und versetzten diesen Rückstand mit 500 ml kaltem Wasser. Hierbei fielen amorphe braune Stoffe in grosser Menge aus. Nach dem Abfiltrieren dieser Ausfällung verblieb eine klare rotbraune Lösung, die wir erneut im Vakuum bis auf etwa 50 ml einengten. Nach Hinzufügen von 500 ml Wasser und Beiseitestellen im Eisschrank konnten wir nach 24 Stunden wiederum einen amorphen braunen Bodensatz abfiltrieren. Diesen Vorgang wiederholten wir so lange bis bei einem Vakuum-Konzentrat des Blütenextraktes auf Wasserzusatz keine Ausfällung mehr auftrat.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung der ausgefallenen Ballaststoffe konnten wir in keinem Falle Flavone finden. Selbst Aglykone und sehr hydrophobe Glykoside wurden durch diese "Wasserfällung" nicht aus dem Rohextrakt entfernt.

Der so vorgereinigte wässrige Extrakt hatte eine gelbbraune Farbe.

Die papierchromatographische Untersuchung ergab, dass sich in diesem Extrakt zwei Hauptglykoside ( $R_f$ -Wert 0,73 und  $R_f$ -Wert 0,67) befanden. Daneben wurden zwei gelbgrün fluo- reszierende Stoffe mit den  $R_f$ -Werten 0,90 und 0,86 gefun- den. Als Lösungsmittelsystem verwendeten wir Äthylazetat- Ameisensäure-Wasser (10+2+3).

## 2. Trennung der Flavonoide

Der klare gelbbraune, gründlich vorgereinigte Extrakt wurde zur Trennung der einzelnen Stoffe zunächst 15 mal mit Äther- Petroläthergemisch (75+25) ausgeschüttelt. Nach Abdestilla- tion des organischen Lösungsmittels verblieb ein gelbgrüner Rückstand, den wir in Äthanol aufnahmen, mit wenigen Tropfen Wasser versetzten und zur Kristallisation in den Kühlschrahk stellten. Nach wenigen Stunden fielen gelbgrüne Kristalle aus, die sich papierchromatographisch als zwei "aglykonisch" fluoreszierende Stoffe (T und U) mit den  $R_f$ -Werten 0,90 und 0,83 erwiesen. (Lösungsmittel Äthylazetat-Ameisensäure-Was- ser 10+2+3.) Ausbeute 210 mg.

Die beiden anderen Stoffe (V und W) mit den  $R_f$ -Werten 0,73 und 0,67 konnten wir mit 10 x 50 ml Äthylazetat aus dem ver- bleibenden wässrigen Extrakt ausschütteln. Nach Abdestilla- tion des Lösungsmittels erhielten wir auch hier eine gelbe kristalline Masse, die aus Äthanol-Wasser umkristallisiert wurde. Ausbeute 300 mg.

Diese beiden Mischkristallisate wurden mit Hilfe der präpa- rativen Papierchromatographie in die einzelnen Flavone auf- geteilt.

## 3. Präparative Papierchromatographie

Je 212 ml Mischkristallisat (Substanz T und U) und 300 mg Mischkristallisat (Substanz V und W) wurden in Methanol ge- löst und auf 30 Bögen Chromatographierpapier Schleicher & Schüll Nr.2043b Gl. aufgetragen. Wir benützten das Gemisch Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3). Die Zonen wurden

unter der UV-Lampe markiert und ausgeschnitten. Durch sechsmaliges kaltes Eluieren mit Methanol entzogen wir dem Chromatographierpapier wieder die Flavonoide. Diese methanolischen Flavonlösungen engten wir auf etwa 20 ml ein und filterten von den ausgefallenen Zellulosestoffen ab. Die methanolischen Lösungen der Substanzen V und W kristallisierten auf Wasserzusatz und 5-8 tages Stehen im Eisschrank aus. Die abfiltrierten kristallinen Produkte wurden aus Äthanol-Wasser umkristallisiert und bei 70°C getrocknet.

Ausbeute: 69 mg Substanz V

41 mg Substanz W

Die weitere Reinigung der braungelben methanolischen Eluate der Substanzen T und U nahmen wir über eine Säule vor, die eine Länge von 20 cm und einen Durchmesser von 5 cm hatte. In der Säule befand sich eine ca. 8 cm hohe Schicht von Magnesol, das mit Methanol angeschwemmt war. Auf je eine solche Säule gaben wir die auf 10 ml konzentrierten methanolischen Eluate der Substanzen T und U. Unter Anwendung von Druck (Eluiergeschwindigkeit etwa 120 Tropfen/Minute) wurden beide Lösungen schnell durch das Magnesol "filtriert". Hierbei blieben im oberen Teil der Säule braune Stoffe adsorbiert, während unten hellgelbe Flavonlösungen abflossen. Die Säulen wurden zweimal mit je 10 ml Methanol nachgewaschen. Beim Einengen der Lösungen und Wasserzusatz bis zur leichten Trübung fielen schon nach einer Stunde gelbe Kristalle aus.

Ausbeute: 21 mg Substanz T

26 mg Substanz U

## II. Isolierung der Blätterflavone A-B-C aus Polygonum orientale L.

### 1. Bereitung des Rohextraktes

Etwa 1,5 kg getrocknete Blätter von Polygonum orientale L. wurden zu einem groben Pulver zermahlen und im Soxhlet mit Methanol erschöpfend extrahiert. Nach dem Abpressen der Drogenrückstände wurde der methanolische Auszug im Vakuum zur Trockene eingedampft und der tiefgrüne Rückstand mit kaltem Wasser (300 ml) ausgezogen. Hierbei blieb ein grosser Teil des Chlorophylls ungelöst zurück. Den wässrigen Rohextrakt stellten wir 3 Tage im Kühlschrank beiseite. Der abgeschiedene rot-braune Bodensatz wurde abfiltriert und verworfen, die überstehende klare rot-braune Lösung im Vakuum bis zur sirupösen Konsistenz eingeengt, mit Wasser (500 ml) versetzt und erneut im Kühlschrank beiseite gestellt. Es schieden sich weitere Mengen des amorphen Niederschlages ab, die verworfen wurden. Diesen Vorgang wiederholten wir in gleicher Weise, bis auf Wasserzusatz keine Ausfällung mehr auftrat. Das Endvolumen betrug etwa 500 ml wässriger Gesamtextrakt.

### 2. Isolierung von Substanz A

Zur Isolierung und Identifizierung des Aglykons wurde der gereinigte wässrige Gesamtextrakt zunächst 10 ml mit etwa 50 ml Äther ausgeschüttelt, der Äther abdestilliert und der gelbe Rückstand mit 50 ml Methanol aufgenommen. Nach dem Einengen des Alkohols auf 20 ml setzten wir 30 ml Wasser zu und liessen auf dem Wasserbad langsam das restliche Methanol verdampfen. Der ausgefallene gelbe Stoff blieb im Wasser suspendiert. Er wurde abfiltriert und zweimal auf die gleiche Art aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 150 mg.

### 3. Isolierung von Substanz B

Wir schüttelten den von Substanz A befreiten wässrigen Gesamtextrakt etwa 10 ml mit einer Mischung von 8 Teilen Äther und 3 Teilen Äthylazetat aus und destillierten das Lösungsmittel im Vakuum ab. Den verbleibenden gelbbraunen Rückstand nahmen wir in Äthanol auf und setzten bis zur Trübung tropfenweise Aqua dest. zu. Dann wurde die Lösung im Eisschrank beiseite gestellt. Nach 6-tägigem Stehen hatte sich ein feinkristalliner, gelber Niederschlag gebildet, der abzentrifugiert und aus Methanol-Wasser umkristallisiert wurde. Die Ausbeute betrug 275 mg.

### 4. Isolierung von Substanz C

Die Substanzen A und B waren vor der Isolierung von Substanz C quantitativ aus dem wässrigen Gesamtextrakt entfernt worden. Papierchromatographische Untersuchungen ergaben, dass in dem wässrigen Rückstand 3 weitere Flavonoide vorlagen, die wir mit den Buchstaben C-D-E bezeichneten. Durch fraktionierte Ausschüttelung gelang es uns nicht die Stoffe zu trennen oder anzureichern. nach etwa 30-maliger Ausschüttelung mit 50 ml Essigester und Abdestillation des Lösungsmittels bis zur Trockne, nahmen wir die kristalline Kruste in 50 ml Äthanol auf. Ein angefertigtes Papierchromatogramm zeigte uns 3 Flavone:

|   |                      |                      |
|---|----------------------|----------------------|
| C | R <sub>f</sub> -Wert | 0,51                 |
| D | R <sub>f</sub> -Wert | 0,37                 |
| E | R <sub>f</sub> -Wert | 0,31. <sup>+</sup> ) |

Die Stoffe D und E lagen in etwa gleicher, Stoff C in geringerer Konzentration vor; sie wurden durch präparative Papierchromatographie getrennt. Durch Kristallisationsversuche aus verschiedenen Lösungsmitteln gelang es uns jedoch nicht Substanz C kristallin zu erhalten. Alle Untersuchungen wurden daher mit der alkoholischen Lösung vorgenommen.

---

<sup>+</sup>) Lösungsmittel: Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3)

## 5. Arbreaktionen

### a) Reduktion <sup>1)</sup>

Zu 5 mg einer methanolischen Lösung wurden in kleinen Portionen Magnesiumpulver und tropfenweise etwa 3 ml 25%ige Salzsäure gegeben. Das Reaktionsprodukt kühlten wir mit kaltem Wasser.

### b) Tauböck-Test <sup>2)</sup>

Einige ml wässrige Lösung wurden in einer Porzellschale zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Azeton aufgenommen und 0,2 g Borsäure/Oxalsäure zugesetzt. Dann brachten wir die Lösung abermals zur Trockne. Der in Äther aufgenommene Rückstand fluoreszierte unter der Analysenquarzlampe intensiv gelb-grün.

### c) Zirkon-Zitronensäure-Test <sup>3)</sup>

Beim Besprühen eines Chromatogrammfleckes mit 2 % methanolischer Zirkonoxychloridlösung bildete sich ein gelber Komplex, der durch 2 % Zitronensäurelösung gelöscht wurde. Nach Behandeln mit Salzsäuredämpfen blieb das Chromatogramm entweder unverändert oder es erschien erneut die gelbe Fluoreszenz.

### d) Eisenchlorid-Reaktion <sup>4)</sup>

3 ml methanolische Flavonlösung wurde mit 3 ml Wasser verdünnt und tropfenweise eine etwa 1%ige Eisenchloridlösung zugesetzt.

---

1) R.WILLSTÄTTER u. H.MALLISON, S.B.preuss.Akad.wiss.phys. math.Kl. 769 (1914)

2) K.TAUBÖCK, Naturwissenschaften 30, 439 (1942)

3) L.HÖRHAMMER u. R.HÄNSEL, Arch.Pharm.Ber.dtsch.pharm.Ges. 284, 276 (1951)

4) J.HOUBEN u. Th.WEYL, Methoden der organ.Chemie, Stuttgart, 1953, Bd.II, pag.366

## 6. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt

Nach wiederholter Umkristallisation aus Äthanol 70%ig wurde der Schmelzpunkt der isolierten Flavone auf dem Kofler-Heizblock bestimmt. In keinem Fall wurde beim Mischschmelzpunkt eine Schmelzpunktdepression beobachtet. Alle angegebenen Werte sind unkorrigiert geblieben.

## 7. Absorptionsspektrum

Die Messungen der methanolischen Flavonlösungen erfolgte im Unicam-Spektrophotometer S.P.500 bei einer Küvettschichtdicke von  $d = 0,1 \text{ cm}$ .

## 8. Papierchromatographie

Wir benutzten die Chromatographierpapiere der Firma Schleicher & Schüll Nr.2043b Gl. (gewaschen). Die Flavone wurden zusammen mit authentischen Testsubstanzen in folgenden Lösungsmittelsystemen chromatographiert:

- a) Äthylazet-Ameisensäure-Wasser (10+2+3)
- b) Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)
- c) Isopropylalkohol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)

Als Sprühreagens diente uns:

- a) Aluminiumsulfatlösung 5 %
- b) bas.Bleiazetatlösung DAB 6 30 %

## 9. Quantitative Hydrolyse

Zur Ermittlung der Spaltprodukte wurden die Glykoside genau eingewogen und mit 15 ml 1%iger Salzsäure-Lösung 1 Stunde lang auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen schied sich eine hellgelbe, flockige Substanz ab. Die überstehende Hydrolysenflüssigkeit war ungefärbt. Wir stellten die Hydrolysenprodukte über Nacht in den Eisschrank und nutschten am nächsten Morgen die Aglykone ab, trockneten auf dem üblichen Wege und brachten sie zur Wägung.

## 10. Neutralisation der Zucker

Wir benutzten den nach den üblichen Methoden gereinigten Ionenaustauscher Dowex 2 (Körnung 20-50 mesh, Feuchtigkeitsgehalt etwa 40 %) der durch Regeneration mit gesättigter alkoholischer Natriumbikarbonatlösung eine alkalische Austauschkapazität erhalten hatte. Nach ausgiebigem Spülen mit 70%igem Äthanol reagierte die Waschflüssigkeit neutral. Zur Entfernung der Säure liessen wir nun die salzsaure Hydrolysenflüssigkeit in kleinen Portionen über den in eine Glassäule gefüllten Ionenaustauscher laufen und prüften den pH-Wert der abtropfenden Flüssigkeiten. (Tropfgeschwindigkeit etwa 20-30 Tropfen/Minute.) Die neutralen Zuckerlösungen wurden auf 5 ml eingeeengt und zu den verschiedenen Identifizierungen benutzt.

## 11. Papierchromatographie der Zucker

Zur Herstellung von Vergleichs-Chromatogrammen trugen wir je 1 ccm unserer Zuckerlösungen im Wechsel mit authentischen Zuckern auf. Wir arbeiteten mit gewaschenem Chromatographierpapier Schleicher & Schüll Nr.2043b Gl. und entwickelten die Chromatogramme absteigend in den Gemischen:

- a) Pyridin-Eisessig-Wasser (1+2+2),
- b) Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5).

Die Laufrist betrug mit beiden Lösungsmittelsystemen etwa 24 Stunden. Nach dem Besprühen mit Anilinphthalat-Lösung <sup>†</sup>) wurden die Chromatogramme 20 Minuten in einen Trockenschrank bei 105°C gelegt. Am Tageslicht zeigten sich braune Flecke.

---

<sup>†</sup>) Nach S.M.PATRIDGE, Nature (London), 164, 493 (1949).  
Lösung von 1,66 g Phthalsäure und 0,93 g Anilin in  
100 ml wassergesättigtem Butanol.

## 12. Zucker-Osazone

Ein Teil unserer neutralen Zuckerlösungen, ca. 3 ml, wurde mit einer Lösung von 0,3 Phenylhydrazinhydrochlorid und 0,45 g Natriumazetat in 3 ml Wasser versetzt und eine Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Die Osazone schieden sich beim Erkalten in Form von kleinen gelblichen Kristallnadeln ab, die auf einer Nutsche abfiltriert und aus 70%igem Äthylalkohol umkristallisiert wurden. Nach zweimaliger Umkristallisation war Schmelzpunktkonstanz erreichbar.

## 13. Azetylierung der Aglykone

Etwa 15 mg Aglykon wurden mit 0,5 g geschmolzenem Natriumazetat und 5 ml Essigsäureanhydrid ca. 3 Stunden im Azetylier-Kölbchen auf der freien Flamme erhitzt. Das abgekühlte Reaktionsprodukt wurde mit 10 ml Wasser versetzt und über Nacht in den Eisschrank gestellt. Das ausgefallene Azetat nutschten wir ab und reinigten die weissen Kristallnadeln durch mehrmalige Umkristallisation aus heissem Methanol.

## 14. Methylierung von Glykosid V

Wir lösten 30 mg des reinen Glykosid V in 20 ml Azeton, dem wir 1,0 g Kaliumcarbonat zugesetzt hatten. Diese Lösung versetzten wir daraufhin in einem 100 ml Schliffkolben mit Rückflusskühler mit 0,9 ml Dimethylsulfat.

Dieses Gemisch erhitzen wir 30 Stunden lang unter Rückfluss auf dem Wasserbad. Die Lösung hatte nach Beendigung der Reaktion eine gelbe Farbe. Dieser Lösung setzten wir nunmehr 10 ml Wasser zu und liessen das Azeton langsam abdunsten. Nach einigen Tagen hatten sich weissgelbe nadelartige Kristalle gebildet, die in Wasser gewaschen und anschliessend im Trockenschrank getrocknet wurden.

Nach erneuter Auflösung der Kristalle in 5 ml Azeton setzten wir 3 ml 2%iger Salzsäurelösung zu und hydrolysierten die Lösung 2 Stunden lang auf dem Wasserbad. Nach Abkühlen

fiel aus dem Hydrolysat ein zunächst gelbes Methylprodukt aus, das nach Waschen mit Wasser und zweimaliger Umkristallisation aus Methanol-Wasser eine gelblich-weiße Farbe hatte. Die Kristallnadeln schmolzen bei 146-148°C.

Dieses Methylprodukt stimmt im Schmelzpunkt mit dem 3-Hydroxy-5,7,4'-trimethylkämpferol überein, das F.RICHTHAMMER <sup>1)</sup> durch Totalmethylierung und Hydrolyse aus Kämpferol-3-rhamnosid erhalten hatte.

### III. Versuche zur Identifizierung von Substanz C, Orientosid und Orientin

#### 1. Säurehydrolyse

Je 5 ml einer wässrigen konzentrierten Lösung von Substanz C, Orientosid und Orientin wurden mit 10 ml "KILIANI-Mixtur" <sup>2)</sup> (35 ml Eisessig, 55 ml Wasser und 10 ml 37%iger Salzsäure) versetzt und 4 Stunden unter häufigem Umschwenken auf der freien Flamme (Rückfluss) erhitzt.

Die Flavonspaltprodukte wurden mit Äthylazetat ausgeschüttelt (weitere Behandlung wie unter 3.).

#### 2. Enzym-Hydrolyse

##### a) Herstellung eines Fermentautolysates aus untergäriger Bierhefe

Nach R.WEIDENHAGEN <sup>3)</sup> wurde untergärige Bierhefe mit fein gepulvertem Diammonphosphat versetzt, bis zur Verflüssigung verrührt und nach einer Stunde mit der

---

1) F.RICHTHAMMER, Dissertation, Universität München (1956)

2) H.KILIANI, Ber.dtsch.Chem.Ges. 63/2, 2866 (1936)

3) R.WEIDENHAGEN in E.BAMANN u. K.MYRBÄCK, Methoden der Fermentforschung, Leipzig (1941), New York (1945), Bd.II, 1749

zehnfachen Menge Wasser verdünnt. Durch die Salzsäurehydrolyse mit Diammonphosphat brachten wir so das Ferment in Lösung und erzielten gleichzeitig durch die Pufferwirkung den optimalen pH-Wert. Nach 5-6 Stunden wurde die überstehende Enzymlösung abdekantiert und zu je 10 ml fügten wir 5 ml der wässrigen Glykosidlösungen hinzu. Diese Ansätze stellten wir in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben 36 Stunden in einen Brutschrank von 36°C. Die Entwicklung der Spaltung kontrollierten wir papierchromatographisch nach 12, 24, 48 und 96 Stunden.

b) Obergärige Hefe

Die Darstellung der Enzymlösung und Durchführung der Spaltung erfolgte in der unter "Untergäriger Bierhefe" beschriebenen Weise, nachdem wir mit Phosphatpuffer die Lösung auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt hatten.

c) Hydrolysengemisch

50 mg eines Gemisches verschiedener Fermente (Hydrolysengemisch "Boehringer", hergestellt aus einer Mischkultur von *Aspergillus niger*, *A.flavus* und *A.oryzae*) mit a) 10 ml Phosphatpuffer pH-Wert 5,6, b) 10 ml Azetatpuffer pH-Wert 5,6 und c) mit 10 ml aqua dest versetzt. Diese Ansätze wurden wie oben beschrieben mit je 5 ml der wässrigen Glykosid-Lösungen vermischt und unter den üblichen Bedingungen der Spaltung unterworfen. Die Überwachung der Spaltung erfolgte wiederum papierchromatographisch nach 12 und 24 und 48 und 96 Stunden.

d) Anthocyaninase

60 mg Anthocyaninase B LOT Factor 5,00 <sup>1)</sup> versetzten wir mit 50 ml Wasser und je 10 ml Glykosidlösung. Der

---

1) Fa.ROHM & HAAS Comp., Philadelphia 5/Pennsylvania (USA)

Spaltversuch erfolgte wiederum in verschlossenem Er-lenmeyerkolben bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank.

e) Emulsinspaltung

Die Herstellung eines Autolytensaftes aus Pferdeleber geschah nach einer von C.NEUBERG und E.HOFFMANN <sup>1)</sup> beschriebenen Methode: 200 g Pferdeleber eines frisch geschlachteten Tieres zerkleinerten wir und trieben die Stücke nach gründlichem Auswaschen durch einen Fleischwolf. Der so erhaltene Organbrei wurde mit der gleichen Menge Wasser und 5 ml Toluol versetzt und in einer verschlossenen Glasflasche 2 Tage bei 37°C aufbewahrt. Der nach dieser Zeit durch Zentrifugieren erhaltene Autolysesaft diente uns als Fermentlösung. Nach Zufügen von je 5 ml der drei in Wasser gelösten Glykoside wurden sie zur Spaltung unter den geschilderten Bedingungen in den Brutschrank gebracht.

Auf Kennzeichnung und Messung der Wirksamkeit (Glukosidasewerte) der einzelnen Enzymlösungen wurde verzichtet, da es uns im vorliegenden Fall nur auf die Prüfung der relativen Spaltungsgeschwindigkeit ankam.

3. Isolierung der Aglykone

Die Hydrolysate der KILIANI-Spaltung wurden mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und etwa 10 mal mit 100 ml Äthylazetat ausgeschüttet.

Die Gewinnung der Flavonspaltprodukte aus den Enzymlösungen erfolgte in ähnlicher Weise durch Ausschütteln der mit 50 ml Wasser verdünnten Enzymlösungen mit 5 mal 50 ml Äthylazetat. Die vereinigten Äthylazetat-Destillationsrückstände trugen wir in Streifen auf Papierchromatographierpapier (Schleicher

---

1) C.NEUBERG u. E.HOFFMANN in E.BAMANN u. K.MYRBÄCK, Methoden der Fermentforschung, Leipzig, 1941, New York, 1945, Bd.II, S.1762

& Schüll Nr.2043b Gl. gewaschen) auf und entwickelten im System Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5). Die vor der Analysenquarzlampe markierten Zonen wurden mit Methanol in Soxhlet eluiert. Die filtrierten Eluate dunsteten wir bis zur Trockene ein und nahmen in 10 ml reinem Äthanol auf.

#### 4. Untersuchung auf Zucker

Das Säurehydrolysat wurde (wie unter 3. beschrieben) zunächst mit Äthylazetat ausgeschüttelt, dann zur Entfernung der Hydrolysesäure über eine mit regeneriertem Ionenaustauscher Dowex 2 gefüllte Säule (4 cm Innendurchmesser und 10 cm Höhe) gegeben. Die Abtropfgeschwindigkeit betrug 30 bis 60 Tropfen/Minute. Nachgewaschen wurde mit 5 ml Wasser. Jeweils die Hälfte der neutralen Lösungen standen zur Papierchromatographie und zur Osazonbildung zur Verfügung. Chromatographiert wurde im Lösungsmittel Pyridin-Äthylazetat-Wasser (1+2+2). Als Sprühreagens benutzten wir Anilinththalatlösung (1,66 g o-Phthalsäure + 0,97 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol).

Auf dem Chromatogramm konnten wir lediglich einen reduzierenden "Zuckerfleck" ( $R_F$ -Wert 0,40) feststellen, jedoch erst nach Erhöhung der Temperatur im Trockenschrank auf 210°C (sonst 100°C).

Wir konnten keine Übereinstimmung mit den sonst bei Flavonglykosiden üblichen Zuckern (z.B. Glukose, Arabinose, Xylose, Rhamnose, Galaktose) finden.

Die Osazonbildung mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung blieb erfolglos.

#### 5. Perjodsäure-Oxydation <sup>1)</sup>

Je 5 $\mu$  Mol Orientosid, Rutin, Scutellarin und Saccharose lösten wir mit 10 $\mu$  Mol Natriummetaperjodat in 0,1 ml Wasser.

---

1) M.VISCONTINI, D.HOCH u. P.KARRER, Helv.Chimic.Acta 38, 642 (1955)

Nach etwa 4 Stunden wurden 2 mg Natriumborhydrid in 0,1 ml Wasser gelöst hinzugegeben. Die Lösungen färbten sich dabei gelb. Wir liessen sie über Nacht stehen, versetzten mit je 0,2 ml in-Salzsäure und erhitzen 15 Minuten im siedenden Wasserbad.

Die Lösungen wurden auf 0,5 ml aufgefüllt. Hiervon genügten 0,02 ml um befriedigende papierchromatographische Resultate zu erhalten. Wir benutzten Papierchromatographierpapier Schleicher & Schüll Nr.2043b Gl. gewaschen, als Lösungsmittel diente Essigester-Pyridin-Wasser (7+2+1). Die Laufzeit betrug etwa 5 Stunden absteigend. Als Vergleichssubstanz wurde Äthylenglykol und Glycerin mit aufgetragen. Das trockene Chromatogramm wurde zunächst kurz mit 0,5%iger Natriumperjodatlösung und nach 5 Minuten mit einer Benzidinlösung (0,5 g Benzidin, 20 ml Eiessig, 80 ml absolutem Äthanol) besprüht. Das Papier färbte sich dabei tief blau, an den Stellen jedoch, wo das Perjodat durch Glycerin oder Äthylenglykol verbraucht wurde, entstanden weisse Flecken. Das Besprühen mit der Benzidinlösung muss sofort erfolgen, da sonst das Perjodat von dem Papier verbraucht wird.

#### 6. Eisen-III-Chlorid-Oxydation

Nach A.STOLL <sup>1)</sup> und H.AUTERHOFF <sup>2)</sup> wurden 0,1 g Eisen-III-Chlorid, 0,3 ml Wasser und etwa 20 mg Orientosid 5 Stunden unter Rückfluss auf der freien Flamme erhitzt. Nach dem Abkühlen schüttelten wir das Reaktionsgemisch mit Äther aus.

Papierchromatographisch fanden wir neben Orientosid ( $R_f$ -Wert 0,35) einen Fleck auf der Höhe des Apigenins (Butanol-Eiessig-Wasser  $R_f$ -Wert 0,86). Die Übereinstimmung mit Apigenin war auch in den Farbreaktionen gegeben:

---

1) A.STOLL, Helv.Chimic. Acta, 1892 (1949)

2) H.AUTERHOFF, Planta Media, Dezember 1953, 1.Jahrg.. Heft 4

|                       |            |        |
|-----------------------|------------|--------|
| unbesprüht            | (UV-Licht) | dunkel |
| Aluminiumsulfatlösung | (UV-Licht) | gelb   |
| bas.Bleiazetatlösung  | (UV-Licht) | gelb   |

### 7. Katalytische Hydrierung

In einer Hydrierapparatur nach C.WEYGAND <sup>1)</sup> wurden 15,9 mg Platinoxid in Eisessig mit Wasserstoff gesättigt und darauf mit 15,1 mg Orientosid versetzt. Die Zeitdauer der Wasserstoffeinwirkung betrug etwa 2 Stunden bis der Manometerwert konstant blieb und für die Hydrierung als beendet angesehen werden musste. Der Wasserstoffverbrauch betrug 1,275 ml. Die Lösung wurde anschliessend chromatographiert. Neben überwiegendem Apigenin waren in geringer Menge die Ausgangssubstanz Orientosid, sowie das Zwischenprodukt (Substanz C) zu erkennen.

### 8. IR-Spektren

Die genau abgewogenen Flavone wurden mit KBr gemischt und in Form von Presslingen spektroskopiert.

|             |                            |
|-------------|----------------------------|
| Vitexin     | 280 $\gamma$ / 300 mg KBr  |
| Orientosid  | 500 $\gamma$ / 300 mg KBr  |
| Orientin    | 1000 $\gamma$ / 300 mg KBr |
| Saponaretin | 180 $\gamma$ / 100 mg KBr  |
| Saponarin   | 1200 $\gamma$ / 300 mg KBr |

Die Aufnahmen wurden im Perkin Elmer IR-Spektrophotometer Nr.21 (Saponaretin, Vitexin, Orientosid) sowie im Leitz IR-Spektrophotometer (Orientin, Saponarin) aufgenommen.

---

1) C.WEYGAND u. A.WERNER, J.prakt.Chemie 149, 330 (1937)

## 9. UV-spektrophotometrische Untersuchungen

Die Messung der Absorptionsspektren erfolgte im Unicam-Quarz-Spektrophotometer SP 500. Der Abstand der Messpunkte betrug  $50 \text{ \AA}$ . Schichtdicke  $d = 1,0 \text{ cm}$ . Konzentration  $0,139 \text{ g/l}$  (Orientosid) bzw.  $0,124 \text{ g/l}$  (Orientin).

### a) UV-Absorptionsspektrum

Zur Messung des Absorptionsspektrums diente uns Lösung von Substanzen in absolutem Äthanol. Diese Stammlösungen benutzten wir zu allen folgenden Absorptionsmessungen.

### b) Spektrum mit Natriumazetat

Je 5 ml der äthanolischen Stammlösung verdünnten wir mit 5 ml absolutem Äthanol und setzten einen Überschuss an frisch getrocknetem und gepulvertem Natriumazetat zu. Während 10 Minuten wurde die Lösung einige Male kräftig durchgeschüttelt, dann der ungelöste Bodensatz abfiltriert. Anschliessend nahmen wir sofort die Messung des UV-Spektrums vor.

### c) Spektrum in alkoholischer Borsäure-Natriumazetatlösung

Zu je 2 ml der Stammlösung setzten wir 2 ml einer gesättigten Borsäurelösung in absolutem Äthanol zu und füllten wiederum mit absolutem Äthanol auf 10 ml auf. Dieser Lösung setzten wir im Überschuss gepulvertes, wasserfreies Natriumazetat zu und liessen sie unter häufigem Umschütteln etwa 20 Minuten stehen. Nach Abfiltrieren des ungelösten Natriumazetates wurde das Spektrum aufgenommen.

### d) Spektrum in Aluminiumchloridlösung mit und ohne Natriumazetat

Je 15 ml Stammlösung versetzten wir mit 3 ml einer  $1,10^{-2} \text{ mol}$  und einer  $1,10^{-3} \text{ mol}$ . Lösung von Aluminiumchlorid (wasserfrei) in absolutem Äthanol. Die Lösungen wurden nach Aufnahme des UV-Spektrums mit einem Überschuss von festem Natriumazetat versetzt, nach 10 Minuten vom Bodensatz abfiltriert und erneut spektrographiert.



## L e b e n s l a u f

Am 27.Juni 1926 wurde ich, Günther WILDI, als Sohn des Kaufmanns Paul WILDI und seiner Ehefrau Gertrud, geb. MEYER, in Saarburg/Trier, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Saarburg trat ich an Ostern 1937 in das Hindenburg-Realgymnasium in Trier ein. 1939 übersiedelten meine Eltern kriegsbedingt nach Konstanz und ich setzte meine Gymnasialzeit bis zur Einberufung zum Wehrdienst 1943 an der dortigen Zeppelin-Oberrealschule fort. Nach einer Verwundung wurde ich im Herbst 1945 aus französischer Kriegsgefangenschaft entlassen und legte im Jahre 1946 das Abitur an der Oberrealschule in Konstanz ab.

Meine 2-jährige Praktikantenzeit absolvierte ich in der Flora-Apotheke, Radolfzell. Das Pharmazeutische Vorexamen bestand ich im September 1948. An der Albert-Ludwig-Universität Freiburg i.Br. begann ich im Winter-Semester 1948/49 mit dem Studium der Pharmazie, das ich 1952 mit dem Pharmazeutischen Staatsexamen abschloss. Am 29.4.1953 erhielt ich meine Approbation als Apotheker. Anschließend begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Leitung von Herrn Prof.Dr. L.HÖRHAMMER.

Die Durchführung der Arbeit musste mehrmals wegen länger dauernder Krankenhausaufenthalte unterbrochen werden. Die Untersuchungen konnten aus diesen Gründen erst jetzt zum Abschluss gebracht werden.



